



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Implication du virus de l'hépatite C dans le développement du carcinome hépatocellulaire

Présenté et soutenu par : *BENMATI Borhane-Eddine Raouf*

Le : 19/06/2016

BOUMARAF Abdessamed

Jury d'évaluation :

Président du jury : *SATTA Dalila* (PROF - UFM Constantine).

Rapporteur : *REZGOUNE Mohamed Larbi* (MA.A - UFM Constantine).

Examineur : *FERTOUL-GHARZOULI Razika* (MC.B - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Implication du virus de l'hépatite C dans le développement du carcinome hépatocellulaire

Présenté et soutenu par : *BENMATI Borhane-Eddine Raouf*
BOUMARAF Abdessamed

Le : 19/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : *SATTA Dalila* (PROF - UFM Constantine).

Rapporteur : *REZGOUNE Mohamed Larbi* (MA.A - UFM Constantine).

Examineur : *FERTOUL-GHARZOULI Razika* (MC.B - UFM Constantine).

Année universitaire
2015 - 2016

*Nous remercions le BON DIEU le tout
puissant de nous avoir accordé la santé et
le courage d'arriver au terme de ce travail.*

Remerciements

Nous remercions M REZGOUNE ML notre encadreur pour sa patience, aide, soutien et pour son sens de responsabilité avec nous. Veuillez trouver ici l'expression notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Un remerciement sincère à notre président de jury Mme SATTI D qui nous fait l'honneur de sa présence et qui a été toujours veillé sur nous durant notre parcours académique au sein de la filière Génétique.

Un vif remerciement à notre examinateur et enseignante Mme GHARZOULI FERIOUL RAZIKA qui nous espérons, trouvera du plaisir à évaluer notre modeste travail de recherche.

Nous remercions aussi le commandant KHMISSE S pour son accueil chaleureux, sa patience et aide durant notre stage au niveau de l'hôpital militaire Constantine.

Nos remerciements vont également aux personnels techniques du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital militaire Constantine.

Un vif remerciement à toute l'équipe de formation Génétique (Licence et Master) pour les efforts consentis dans notre formation durant ces années d'études.

Dédicaces

Je dédie mon mémoire en particulier à ma très chère mère, mon cher père, mes grandes parents, mes tantes et oncles et à toute ma famille pour leur soutien et encouragements tout le long des mes années.

Ainsi que tous mes amis proches, toutes les personnes chères à moi qui sont à mes côtés et dans mes pensées et tous ceux qui m'ont soutenue durant cette année et les années passées.

Dédicaces

En gage de ma profonde affection, je dédie cet humble travail :

À mes parents pour tous sacrifices, leurs endurance et souffrances. Consentis pour notre devenir, vous méritez infiniment plus.

À tous les membres de ma famille.

À tous mes amis et surtout ; Younes, Hamza, Azize, Nasro, Badri, Sami, Sofiane, Akram, Imad, Taki, Faycel, Seif, Walid, Achor, Kaninou Hamdi, Oussama, Atef, Sucre, Mounir, Impo, Gamach, Salah, Morjana, Abba, Abdou, Dala3a, Noredine, et chikhe Khmissi salim et chikhe Jamel w chikhe Said, ami Fodil, Lina ,Rayen, Mimi, Fatima et tous les gens qui m'ont soutenu pour réaliser ce travail.

Abréviations

- AcHB / AcHC** : Anticorps du virus de l'hépatite B / C
- AFBI** : AFlatoxine BI
- AFP** : Alpha-Fœto-Protéine
- AgHB / AgHC** : Antigène du virus de l'hépatite B / C
- ALT** : Alanine Amino-Transférase
- ARFP** : Alternate Reading Frame Protein
- ATP** : Adénosine Tri-Phosphates
- CHC** : Carcinome Hépato-Cellulaire
- CLDN1** : CLauDiNe-1
- DCSING** : Dendritic Cel/-Specific ICAM3-GrabbingNon integrin
- DO** : Densité Optique
- eIFs** : eukaryotic Initiation Factor
- ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- GAG**: Glyco-Amino-Glycanes
- GDP / GHP** : Guanosine Di-Phosphates / Tri-Phosphates
- HGS** : Heteroduplex Gel Shift
- hRNP** : heterogeneous Ribo-Nucleo-Protein
- HVR 1** : Hyper-Variable Region 1
- Ig** : Immunoglobulines
- INF** : INterFérons
- INPES** : Institut National de Prévention et d'éducation pour la Santé
- IRES** : Internal Ribosomal Entry Site
- ITAF** : IRES Trans-Acting Factors
- La** : Lupus antigen
- LDL / LDLR** : Low-Density Lipoprotein / Low-Density Lipoprotein Receptor
- L-SING** : Liver-Specific ICAM3-Grabbing Non integrin
- NS** : Non structurales
- OCLN** : OCcLudiNe
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- ORF**: Open Reading Frame

PAL : Phosphatases ALcalines
PCR: Polymerase Chain Reaction
PKR : Protéine Kinase R
Protéine F : Frameshift
PTB : Pyrimidine Tract-binding Protein
RdRp : ARN-polymérase ARN-dépendante
RE : Réticulum Endoplasmique
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SRB1: Scavenger Receptor B1
SSCP : Single Strand Conformational Polymorphism
UTR : Un-Translated Region
VHB / VHC / VHD : Virus de l'Hépatite B / C / D
VLDL : Very Low-Density Lipoprotein

Table des matières

Introduction

Page 01

Partie bibliographique

Chapitre I : le virus de l'hépatite C

1- Découverte du virus de l'hépatite C	03
2- Épidémiologie et prévalence du VHC	03
3- Le virus de l'hépatite C	04
3-1 Taxonomie et diversité génétique	04
3-2 Caractéristiques générales du VHC	07
3-3 Organisation du génome viral	08
3-3-1 Régions non transcrites	08
3-3-2 La poly-protéine du VHC et sa maturation	09
3-4 Protéines virales	10
3-4-1 La protéine capside	12
3-4-2 Les glycoprotéines E1 et E2	12
3-4-3 La protéine p7	13
3-4-4 La protéine NS2	13
3-4-5 Le complexe NS3/4A	14
3-4-6 La protéine NS4B	14
3-4-7 La protéine NS5A	15
3-4-8 La protéine NS5B	16

3-4-9 La protéine F	16
3-5 Cycle viral	16
3-5-1 Entrée du VHC dans la cellule hôte	17
3-5-2 Traduction virale	18
3-5-3 Réplication de l'ARN viral	20
3-5-4 Assemblage et libération	21
4- Transmission	22
5- Évolution de la maladie et manifestations cliniques	23
5-1 Infection aiguë	23
5-2 Infection chronique	24
5-3 Cirrhose du foie	24
5-4 Carcinome hépatocellulaire	24
5-5 Manifestations extra-hépatiques	25
6- Dépistage	25
6-1 Détection d'anticorps anti-VHC	25
6-2 Détection et quantification de l'ARN viral	26
6-3 Biopsie du foie	26
7- Traitements et vaccination	27
8- Variabilité génétique du VHC	27
8-1 Méthodes de typage du VHC (génotypes et sous-types)	27
8-1-1 Séquençage	27
8-1-2 PCR spécifique de type	27
8-1-3 Etude du polymorphisme de restriction	28
8-1-4 Hybridation inverse	28
8-1-5 Sérotypage	28
8-2 Méthodes de typage du VHC (quasi-espèce)	28
8-2-1 Séquençage en nucléotides	28
8-2-2 Single Strand Conformational Polymorphism	29
8-2-3 Heteroduplex Gel Shift	29
8-3 Implications cliniques et épidémiologiques de la variabilité génétique	29
8-3-1 Génotypes	29
8-3-2 Quasi-espèce	30

Chapitre II : le carcinome hépato-cellulaire

1- Définition	34
2- Épidémiologie	34
3- Étiologie du CHC	36
3-1 Origine virale	37
3-2 Origine toxique	38
4- Aspect physiopathologique	40
4-1 Physio-Pathologie	40
4-2 Pathologie tumorale	40
5- Mécanisme moléculaire de l'hépatocarcinogénèse	41
5-1 Mutations d'oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans les CHC	42

5-2 Altérations chromosomiques	45
5-3 Modifications épigénétiques	47
6- Diagnostic du CHC	48
6-1 Aspect clinique	48
6-2 Aspect biologique	49
7- Pronostic	49
8- Traitement	50
8-1 Les traitements curatifs	50
8-2 Les traitements palliatifs	50

Partie pratique

Diagnostic biologique du VHC

1- Principe du test	51
2- Composition de la trousse	52
3- Matériel nécessaire	53
4- Reconstitution des réactifs	54
5- Dépôt des échantillons à analyser	54
6- Mode opératoire	55
7- Calcul et interprétation des résultats	57
8- Vérification spectrophotométrique du dépôt des échantillons et des réactifs	58
Discussion	60
Conclusion et perspectives	63
Références bibliographiques	64

Résumés

Liste des figures

Figure 01 : Arbre phylogénétique du VHC	6
02 : Structure du VHC	8
03 : Organisation du génome du VHC	10
04 : Caractéristique des protéines virales	11
05 : Cycle de réplication du VHC	17
06 : Aspect cytologique du carcinome hépatocellulaire.....	41
07 : Hépto-carcinogènèse : un processus multi-étapes	42
08 : Les voies de signalisation altérées dans l'hépto-carcinogènèse	43
09 : Voies principales de l'hépto-carcinogènèse définies par des altérations génétiques et des paramètres cliniques	47
10 : Composition de la trousse du test VHC-IgG ELISA (Monolisa™ BIO-RAD)	52
11 : Matériel nécessaire pour la réalisation du test VHC-IgG ELISA (Monolisa™ BIO-RAD)	53
12 : Répartition selon le sexe des cas de VHC(+) enregistrés au niveau de l'hôpital militaire ...	59

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition de la trousse du test VHC-IgG ELISA (Monolisa™ BIO-RAD)	52
---	----

Introduction

Les cancers sont un problème majeur de santé publique et font l'objet de nombreux programmes de prévention et de dépistage dans le monde. Les objectifs actuels sont de prévenir et de limiter l'exposition aux facteurs de risque ainsi que de dépister plus précocement la maladie pour mieux la traiter. Ces actions associées aux progrès médicaux conduisent au recul de l'incidence des cancers les plus communément retrouvés dans le monde ainsi qu'au recul de la mortalité associée. Malgré tous les progrès consentis, le cancer est en passe de devenir une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les décennies à venir dans toutes les régions du monde.

Le cancer du foie représente le cinquième cancer (en termes d'incidence) et le deuxième (en termes de mortalité) (**GLOBOCAN, 2012**). Le Carcinome Hépato-Cellulaire (CHC) représente 85 à 90 % des cancers primitifs du foie. Il présente plusieurs caractéristiques épidémiologiques intéressantes : des différences de distribution ont été remarquées entre les régions géographiques, les groupes ethniques, mais aussi en fonction du sexe et de la présence de plusieurs facteurs de risque liés à l'environnement. La très forte mortalité du CHC est essentiellement due à un diagnostic tardif et à l'inefficacité des traitements proposés pour les stades avancés de la maladie. La détection des premières altérations dans les hépatocytes pourraient alors permettre de découvrir beaucoup plus précocement l'évolution vers un CHC, et permettre de proposer des traitements évitant la progression vers le cancer. Parmi les étiologies bien établies aujourd'hui du CHC, le Virus de l'Hépatite C (VHC) occupe une place de choix (**El-Serag et al., 2007**).

Le VHC est responsable de maladies chroniques du foie. Il affecte plus de 170 millions de personnes dans le monde, ce qui est quatre fois plus que la population atteinte du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Sa prévalence est de 3 à 4 % en Europe et jusqu'à 10 % dans certains pays africains (Gabon, Égypte) où il représente actuellement un des plus sérieux problèmes de santé publique. Ces chiffres sont probablement sous-estimés car 80 % des sujets infectés sont asymptomatiques et ne sont donc pas forcément dépistés. L'infection se caractérise par un taux élevé de passage à la forme chronique (80 %) alors qu'il est bien plus faible pour le virus de l'hépatite B (5 %). L'infection chronique par le VHC favorise la cirrhose (20 à 30 % des cas) et le CHC (30 % après 10 ans d'évolution cirrhotique) (**Alter, 2005**). En dépit des avancées considérables pour un traitement pour les infections de VHC, les limites de ces thérapies et le fardeau grandissant pour la santé publique soulignent l'importance de stratégies préventives pour réduire la diffusion mondiale de la maladie. Or, le développement de vaccins, une stratégie hautement privilégiée, est entravé par la diversité génétique du VHC et la capacité du virus à échapper au système immunitaire (**Suzuki et al., 2007 ; Chmielewska et al., 2015 ; Walker et Grakoui, 2015**).

Bien que notre compréhension du VHC ait grandement progressé depuis l'isolation de son génome, plusieurs facettes du cycle viral et de la pathogénèse du VHC restent nébuleuses. Une connaissance approfondie de la biologie du VHC est requise pour répondre adéquatement aux problématiques présentes et futures posées par ce virus.

L'objectif de ce mémoire de Master est de faire, tout d'abord, une revue bibliographique bien documentée et actualisée sur le VHC et le CHC que nous avons divisé en deux grands chapitres :

- Le premier chapitre concerne la biologie du VHC, plus particulièrement centrée sur sa génétique, son cycle lytique et l'impact de cette réplication virale dans les pathologies associées au VHC.
- Le deuxième se focalise sur l'aspect physiopathologique du CHC et plus particulièrement les mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse médiée par le VHC.

Dans la partie pratique de ce mémoire, nous avons essayé d'apprendre et d'appliquer les techniques de diagnostic biologique du VHC utilisées au niveau de l'hôpital militaire - Constantine.

Partie
bibliographique

Chapitre I

virus de l'hépatite C

1- Découverte du virus de l'hépatite C :

Vers le milieu des années 1975, des tests sérologiques permirent de détecter la présence d'un agent infectieux dans les banques de sang. Les patients, suite aux transfusions sanguines, développaient une sévère maladie chronique inflammatoire du foie. À cette époque, les hépatites A et B avaient été découvertes et des tests avaient été instaurés pour permettre leur détection. Les personnes contaminées répondant négativement à ces tests étaient alors dites atteintes d'un agent infectieux inconnu causant « **l'hépatite post-transfusionnelle non-A non-B** » (Feinstone et al., 1975).

En 1989, cette entité pathologique fut rebaptisée l'hépatite C, et son agent étiologique fut appelé Virus de l'Hépatite C (VHC) suite à son isolation et caractérisation par *Michael Houghton*, *Qui-Lim Choo*, et *George Kuo*. Dans la même année, ces chercheurs ont achevé le séquençage complet d'un génome du VHC par des techniques de clonage moléculaire (Choo et al., 1989).

La découverte du VHC représente la première identification d'un génome viral par l'usage de la biologie moléculaire plutôt que de la microbiologie classique.

2- Épidémiologie et prévalence du VHC :

L'origine et la propagation du VHC dans la population ont été le sujet de nombreuses recherches. Ces informations sont très importantes car elles permettent de prédire l'impact clinique ainsi que de prévenir et mieux contrôler la propagation du virus dans l'avenir. Du fait que peu de données sont disponibles pour les pays en voie de développement, il est certain que la prévalence réelle est sous-estimée. Les dernières données épidémiologiques rapportées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2004 estimait la prévalence globale mondiale de l'infection due au VHC à 2,2 %, ce qui correspond à environ 170 millions de personnes positives à travers le monde et que 3 à 4 millions de plus étaient infectées à chaque année (OMS, 2004).

Par manque de données collectées auprès des registres de santé locaux, il n'est pas possible de déterminer la prévalence de l'infection au VHC pour chacun des pays participant à l'OMS. Globalement, on remarque que la prévalence du Nord de l'Europe est faible, en dessous de 1 %, alors que celle du Nord de l'Afrique est au-dessus de 2,9 %. Dans le même sens, la plus faible prévalence rapportée se situe entre 0,01 % et 0,1 % dans les pays du Royaume-Uni et de la Scandinavie alors que la plus forte, entre 15 % et 20 %, serait en Égypte (Alter, 2005).

Vu la technologie existante dans les pays industrialisés, on pourrait s'attendre à observer une prévalence nettement moindre comparativement aux pays en développement. Cependant, et dû en grande partie aux banques de sang contaminées, le VHC s'est rapidement répandu par les dons de sang et les transfusions sanguines.

L'estimation du taux de personnes nouvellement infectées par année, n'est pas chose aisée à déterminer et ce pour plusieurs raisons :

- a- L'infection au VHC est souvent asymptomatique et donc, les personnes infectées n'en sont souvent pas conscientes,
- b- Les tests disponibles ne permettent pas de distinguer une infection aiguë, qui survient soudainement, d'une infection chronique, qui est une évolution de l'infection aiguë,
- c- Plusieurs pays ne collectent pas de données sur les infections aiguës. Cette situation est désavantageuse car l'incidence de l'infection au VHC peut être d'une grande utilité afin d'évaluer la vague de complications associées au développement d'infection chronique qui déferlera dans les années à venir (Alter, 2005).

L'Algérie, pays considéré comme « émergent » en pleine transition épidémiologique, appartient à la zone de moyenne endémicité. En effet, la prévalence des anticorps anti-VHC est estimée à 1 % (INPES, 2007). La bibliographie rapporte seulement deux études de grande ampleur menées sur la population algérienne : la première, nationale, sur l'hépatite B, réalisée en 1998, rapporte une prévalence moyenne du portage de l'Ag HBS à 2,15 % (IPA-INSP). La deuxième étude régionale, réalisée en 2005, incluant 6 Wilayas de l'est du pays (Batna, Msila, Khenchela, Oum El Bouaghi, Tébessa et Souk Ahras) rapporte une prévalence moyenne de 3,47 % pour l'hépatite C et de 1,57 % pour l'hépatite B. Ces études confirment que l'Algérie, en regard de l'hépatite C, est une zone de moyenne endémie avec une variabilité inter-région. Aucune différence selon le sexe ou l'âge n'a été observée (Benbekhti, 2013).

3- Le virus de l'hépatite C :

3-1- Taxonomie :

Le VHC est composé d'un génome d'Acide Ribo-Nucléique (ARN) à sens positif (ARN(+)) et est classifié dans la famille des *Flaviviridae*. Les *Flaviviridae* sont divisés en quatre genres : *flavivirus* (le virus de la fièvre jaune, le virus de la dengue), *pestivirus* (le virus de la diarrhée bovine, le virus de la peste porcine) et *hepacivirus* représenté par le VHC. Les *pegivirus* qui est un nouveau genre comprenant le virus de l'hépatite G et les virus GB (GBV-A, GBV-B, GBV-C).

Le VHC est très similaire aux autres membres de cette famille en termes d'organisation génomique, de stratégie de répllication de l'ARN viral et de morphologie du virion, mais s'y différencie notamment par son mécanisme de traduction de la poly-protéine. D'autant plus que la majorité des *Flaviviridae* sont transmis aux vertébrés par des arthropodes contrairement au VHC qui n'infecte que l'humain et le chimpanzé (Dixit et al., 1995 ; Laskus et al., 2000).

3-2- Caractéristiques générales du VHC :

Le VHC est un virus enveloppé d'environ 40 à 70 nm de diamètre, tel que déterminé par filtration et par microscopie électronique. Il possède une nucléocapside de 30 à 53 nm de diamètre qui est enveloppée d'une membrane de bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales E1 et E2. Sur la particule virale, ces deux protéines d'enveloppe s'assemblent en complexes stabilisés par des ponts disulfures. La nucléocapside est composée de multiples copies de la protéine virale Core, formant une structure icosaédrique entourant l'ARN génomique (**figure 2**).

Les particules du VHC circulent sous des formes variées dans le sérum de patients infectés. Certains virus sont associés à des lipoprotéines de faible densité (Low-Density Lipoprotein (LDL)) ou de très faible densité (Very Low-Density Lipoprotein (VLDL)) qui représentent la fraction infectieuse des virions. D'autres circulent liés à des Immunoglobulines (Ig) ou comme virions libres. Cette particularité explique l'hétérogénéité des particules virales, ainsi que leur faible densité (environ 1,10 g/ml). L'homme et le chimpanzé sont les seules espèces à être sensibles au VHC, la maladie étant similaire chez l'un comme chez l'autre.

Le VHC est thermorésistant, il n'est détruit dans les fractions coagulantes, qu'à une température supérieure à 80°C pendant 72 h. Il est également résistant aux rayons ultra-violets (Savey *et al.*, 2003 ; Zanetti, 2003).

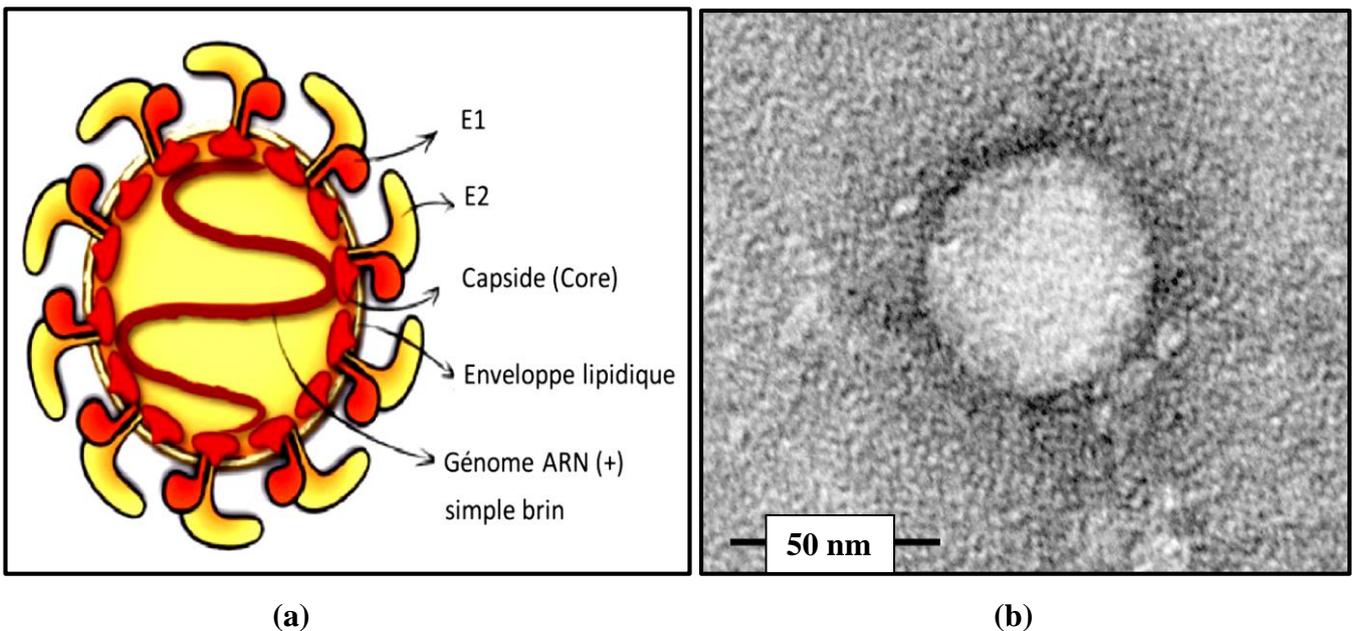


Figure 2 : Structure du VHC.

(a) Représentation schématique d'une particule virale (d'après Thimme *et al.*, 2012).

(b) Photographie sous microscopie électronique (coloration négative) d'une particule virale (d'après Catanese *et al.*, 2010).

- **Diversité génétique :**

C'est au début des années 1990 que fut découverte la surprenante hétérogénéité génétique du VHC (**Bukh et al., 1995**). Cette diversité découlerait de la rapidité de répllication de l'ARN génomique de même que de la faible fidélité de la polymérase virale, aboutissant à de fréquentes mutations du génome viral. En effet, l'absence d'activité correctrice de son ARN polymérase ARN dépendante, ainsi qu'à une répllication intense du virus (10^{12} virions par jour) font que le taux d'erreur de la polymérase est d'environ 10^{-3} substitutions nucléotidiques par génome et par an. L'analyse phylogénétique des différents génotypes du VHC permet d'évaluer l'émergence et la diversification de ces derniers au cours du temps. Les génotypes auraient émergé il y a 500 à 2000 ans et auraient divergé en sous-types il y a 300 ans. Le brassage des populations, et l'introduction d'autres modes de transmission (transfusion sanguine, toxicomanie) ont été à l'origine de la diffusion rapide du virus, et à la diversification des sous-types. Cette diversité explique en partie la capacité du virus d'échapper au système immunitaire ainsi que les difficultés rencontrées dans la compréhension des mécanismes de pathogénèses et la mise au point d'antiviraux (**Zanetti, 2003**) Cette variabilité génétique du VHC s'exprime à deux niveaux : le génotype et la quasi-espèce.

➤ En 1994, un article consensus proposait de classifier les divers variants du VHC par une méthode phylogénique (séquençage et construction d'arbres phylogéniques) : six principaux génotypes (1 à 6) et plus de 50 sous-types (1a, 1b, 2a, 2b, etc.) ont été décrits et ceci dans l'ordre chronologique de leur description (**figure 1**) (**Simmonds et al., 1994**).

La séquence nucléotidique des différents sous-types varie de 20 % à 25 % comparativement à celle des génotypes qui varie de 31 % à 33 %. Malgré la diversité de séquence du VHC, tous les génotypes partagent un grand cadre de lecture (Open Reading Frame (ORF)) de taille similaire, sinon identique, ainsi qu'une expression clinique pouvant mener à de la fibrose, à une cirrhose du foie ou à un Carcinome Hépatocellulaire (CHC) (**Simmonds et al., 2005**).

Le taux de mutations varie significativement suivant les différentes régions du génome. En effet, les régions non traduites du génome (le 5' et le 3' Un-Translated Region (UTR) ou NTR) sont hautement conservées (plus de 90 % d'identité) parmi tous les génotypes du VHC. D'autres parties, telles que les séquences codantes des protéines sont aussi conservées. Les plus hauts taux de mutations sont retrouvés dans les séquences codantes des deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (**Simmonds et al., 2005 ; Troesch et al., 2006**). Les différents génotypes ont marqué les diverses régions du monde à des fréquences variables. Les génotypes 1 et 2 ont une distribution mondiale,

résultant probablement de la transmission par les transfusions sanguines, par des méthodes chirurgicales non-appropriées et par l'injection de drogues (Alter, 2005).

Malgré leur étendue mondiale, on retrouve le sous-type 1a principalement au États-Unis et en Europe du Nord alors que le sous-type 2 est retrouvé plus fréquemment au Japon et dans le nord de l'Italie. Le génotype 3 est plus fréquent sur le sous-continent indien et a été introduit aux États-Unis et en Europe dans les années 1960-70. Le génotype 4, concentré en Afrique et dans le Moyen-Orient, est très diversifié. Quant aux génotypes 5 et 6, ils sont rares et isolés géographiquement : le génotype 5 est retrouvé dans le sud de l'Afrique alors que le génotype 6 est spécifique au Sud et à l'Est asiatiques (Hoofnagle et al., 2002).

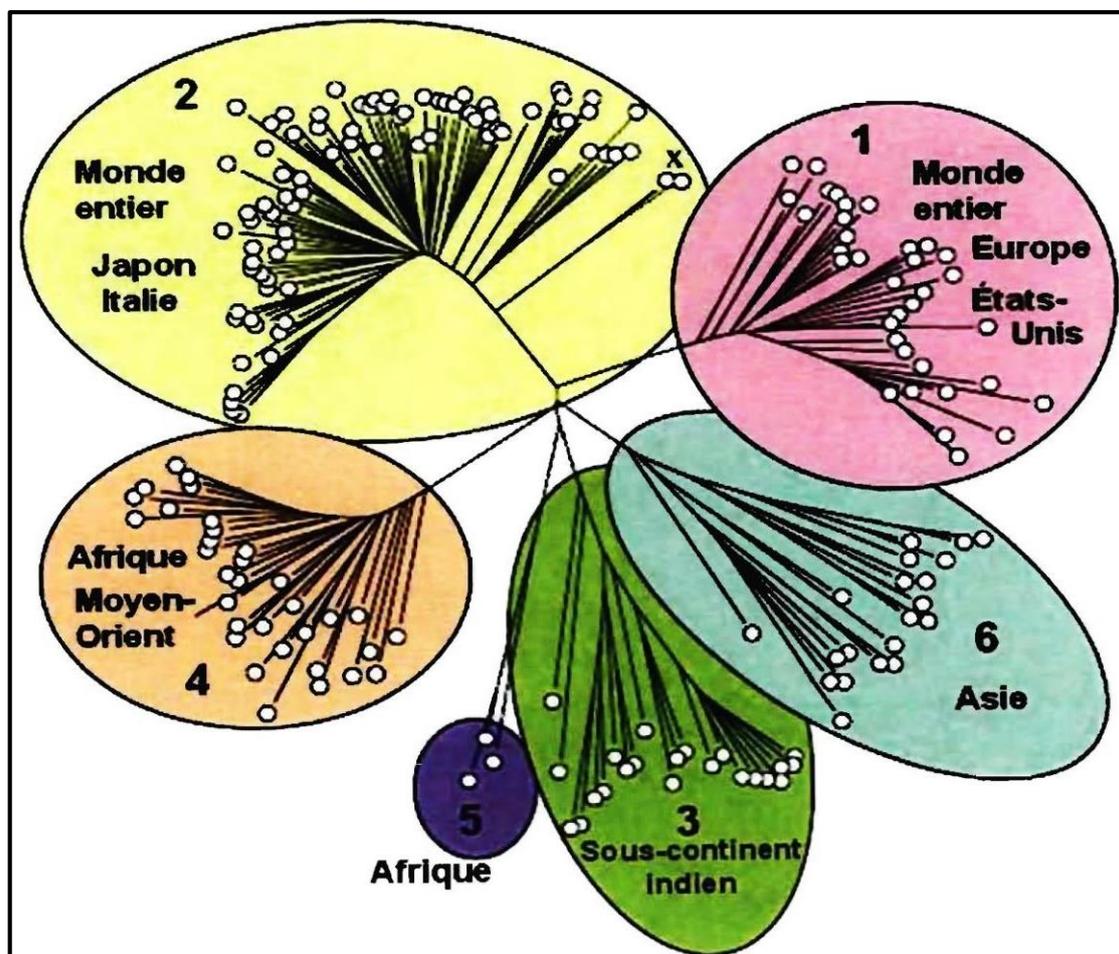


Figure 1 : Arbre phylogénétique du VHC obtenu par le rassemblement des séquences de la protéine NS5B publiées avant 2005 représentant les principaux génotypes, 1 à 6 et les principaux sous-types (d'après Simmonds et al., 2005).

➤ Cette grande variabilité génétique du virus conduit à son expansion sous forme de nombreux variants au sein d'un même individu : on parle de quasi-espèces. De ce fait, dans le sérum des personnes infectées, ce n'est pas une seule espèce d'ARN du VHC qui est retrouvée, mais une

population de génomes viraux, variant entre 1 % et 5 % dans leur séquence nucléotidique (**Martell et al., 1992**).

L'ensemble de ces variants appartient à un même génotype et ne diffèrent entre eux que par quelques mutations alors que les génotypes du VHC présentent entre eux bien plus de différence de séquence. Par ailleurs, on distingue chez un même malade les variants majeurs qui représentent au moins 10 % de la quasi-espèce des variants mineurs qui représentent moins de 10 % de la population quasi-espèce (**Simmonds et al., 2005**).

La quasi-espèce est, d'une part, engendrée par la non-fidélité de l'ARN polymérase ARN dépendante et, d'autre part, sélectionnée par le système immunitaire de l'hôte. La sélection des différents variants d'une quasi-espèce n'est pas uniquement le résultat de la pression exercée par le système immunitaire : certains variants peuvent être plus adaptés à un environnement cellulaire que d'autres (lymphotropisme possible de certaines souches virales), d'autres variants sont défectifs et sont donc sélectionnés négativement. Pour le VHC, ces quasi-espèces diffèrent le plus souvent par leur région hypervariable (Hyper-Variable Region 1 (HVR 1) (**Houghton et al., 1991; Weiner et al., 1991; Weiner et al., 1992**).

3-3- Organisation du génome viral :

Le génome du VHC est un ARN simple brin de polarité positive (ARN(+)) pouvant être traduit directement par les ribosomes de la cellule hôte et dont la longueur est d'environ 10 000 bases. Comme pour tous les virus à ARN, l'ARN viral est le moteur du cycle de réplication virale. En effet, l'ARN sert de substrat dans les processus de traduction, de réplication et d'assemblage du virus. Des éléments retrouvés dans les régions UTR aux extrémités 5' et 3' (5'NTR et 3'NTR) du génome ainsi que dans le grand ORF, d'environ 9700 nucléotides, codant la poly-protéine virale permettent de contrôler les divers processus du cycle de réplication virale (**Suzuki et al., 2007**).

3-3-1- Régions non transcrites :

Bien qu'il existe quelques variations nucléotidiques caractéristiques du génotype ou du sous-type dans le 5' UTR, cette région est l'une des plus conservées du génome parmi les isolats du VHC. Longue de 341 nucléotides, la principale caractéristique de cette région non-transcrite en 5' est de contenir un site d'entrée interne du ribosome (Internal Ribosomal Entry Site (IRES)). Cet IRES, structuré en 4 domaines (numérotés de I à IV) hautement conservés, est essentiel à l'initiation coiffe indépendante de la traduction de l'ARN viral. En plus des éléments nécessaires

pour la traduction de l'ARN, les 43 premiers nucléotides du 5' UTR sont requis pour la réplication (**Jopling et al., 2005**).

À l'extrémité opposée du génome se trouve le 3' UTR dont la longueur varie entre 200 et 235 nucléotides. Cette région peut être divisée en trois parties : une région variable, une séquence poly-U et une région invariable de 98 nucléotides, nommée région 3' X. La séquence poly-U, dont la longueur et la séquence varient, ainsi que la région 3' X, structurée en 3 tiges-boucles hautement conservées, s'avèrent nécessaire à la réplication en culture cellulaire de même que pour l'infectiosité chez le chimpanzé (**Yi et Lemon, 2003**).

3-3-2- La poly-protéine du VHC et sa maturation :

Le génome du VHC contient un grand cadre de lecture encadré par les régions 5' et 3' UTR. La traduction de l'ARN viral par les ribosomes cellulaires est médiée par l'IRES et mène à l'expression d'une poly-protéine d'environ 3 000 acides aminés (aa). Ce précurseur sera ensuite clivé de manière co- et post-traductionnelle par des protéases cellulaires et virales pour aboutir à l'obtention d'au moins 10 protéines virales matures. Les protéines structurales capsidique, E1 et E2 se situent dans la portion N-terminale de la poly-protéine et sont impliquées dans l'assemblage de la particule virale. La portion C-terminale de la poly-protéine code pour les protéines non-structurales (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B qui sont impliquées dans la formation du complexe de réplication. Entre les portions structurale et non-structurale de la poly-protéine se trouve la protéine p7 dont l'appartenance à l'un ou l'autre de ces deux groupes reste à discuter.

La maturation des jonctions core-E1, E1-E2, E2-p7 et p7-NS2 est assurée par des peptidases signal de la cellule hôte. La maturation au site NS2-NS3 consiste en une rapide réaction d'auto-clivage impliquant la cystéine-protéase NS2 et la portion N-terminale de NS3. Le clivage au site NS3-4A est une réaction intramoléculaire impliquant le domaine protéase de NS3, soit les 180 aa à son extrémité N-terminale, et la protéine NS4A. Les sites en aval, soit les jonctions 4A-4B, 4B-5A et 5A-5B sont clivés par la protéase NS3 en collaboration avec son cofacteur NS4A (protéase NS3/4A). L'ordre de maturation prédit des protéines NS3-5B est NS3-4A~NS5A-5B~NS4A-4B~NS4B-5A (**figure 3**).

Les protéines matures, qui ont chacune la capacité de s'associer aux membranes de la cellule, serviront aux divers processus du cycle de réplication virale menant à la formation de nouveaux virions infectieux qui pourront s'établir de manière permanente dans l'organisme hôte grâce à l'habileté des protéines virales d'interférer avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire importantes pour la formation d'une réponse immunitaire (**Bartenschlager et al., 2004 ; Suzuki et al., 2007**).

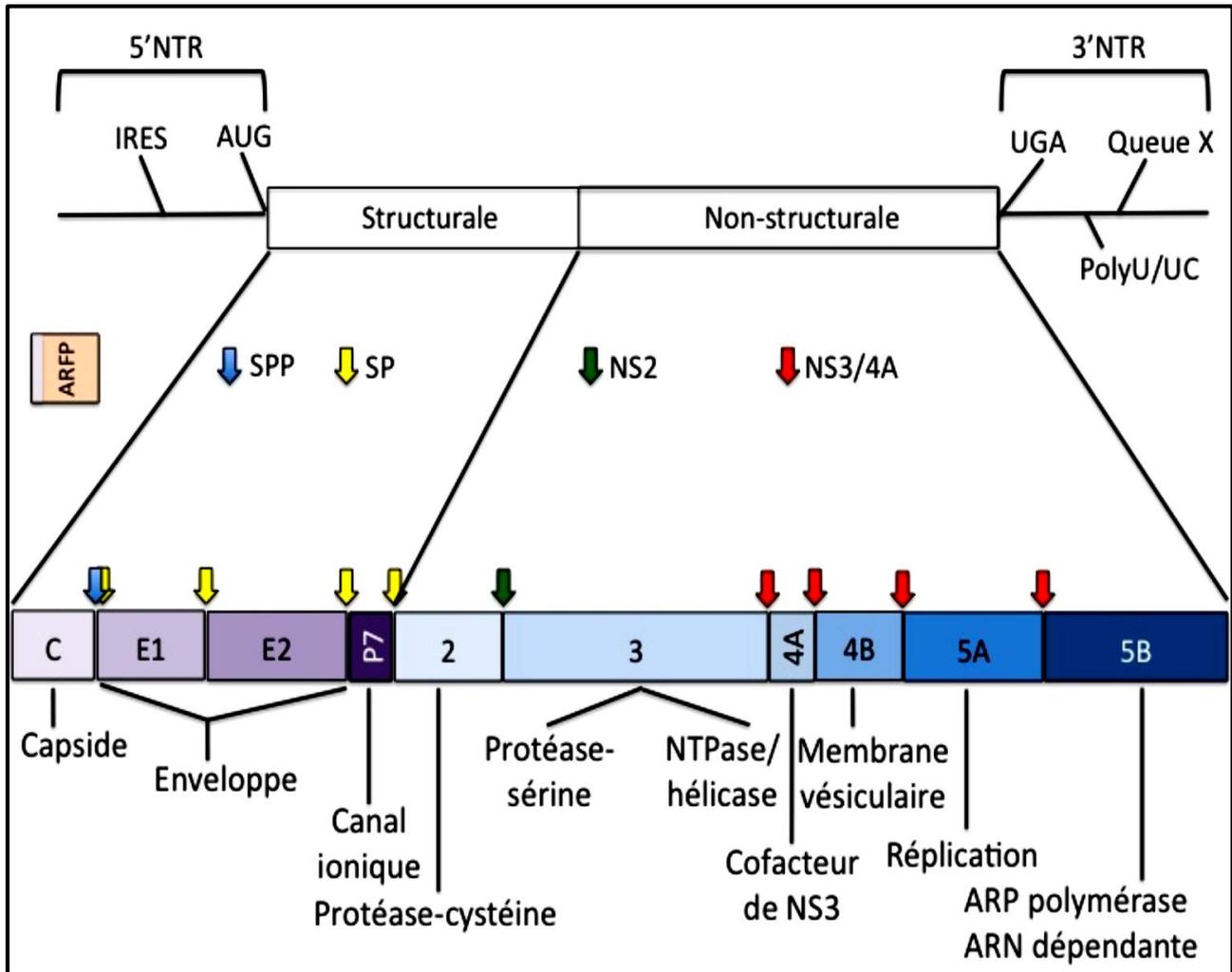


Figure 3 : Organisation du génome du VHC (d'après Bartenschlager et al., 2004).

L'ORF permettant la production de la poly-protéine est bordé de 2 séquences non codantes : 5'NTR et 3'NTR. La partie 5'NTR contient le site IRES et permet l'initiation de la traduction de la poly-protéine. La partie 3'NTR contient une séquence poly U/C et une queue X nécessaires à la réplication du génome. La poly-protéine est clivée successivement par des signaux peptidases cellulaires (**flèches bleues et jaunes**), puis par la protéase et son cofacteur NS3/4A (**flèches rouges**) afin de produire les protéines structurales (core, E1, E2, P7 et 2) et non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B).

3-4- Protéines virales :

Au total, 10 protéines sont produites à partir de la poly-protéine du VHC. Une 11^{ième} protéine, l'ARFP (Alternate Reading Frame Protein), serait exprimée indépendamment suite à un changement de cadre de lecture des ribosomes. Dans les paragraphes qui suivent, les protéines

virales et leurs fonctions seront décrites dans le même ordre dans lequel elles apparaissent sur la polyprotéine du VHC (figure 4) (Walewski et al., 2001).

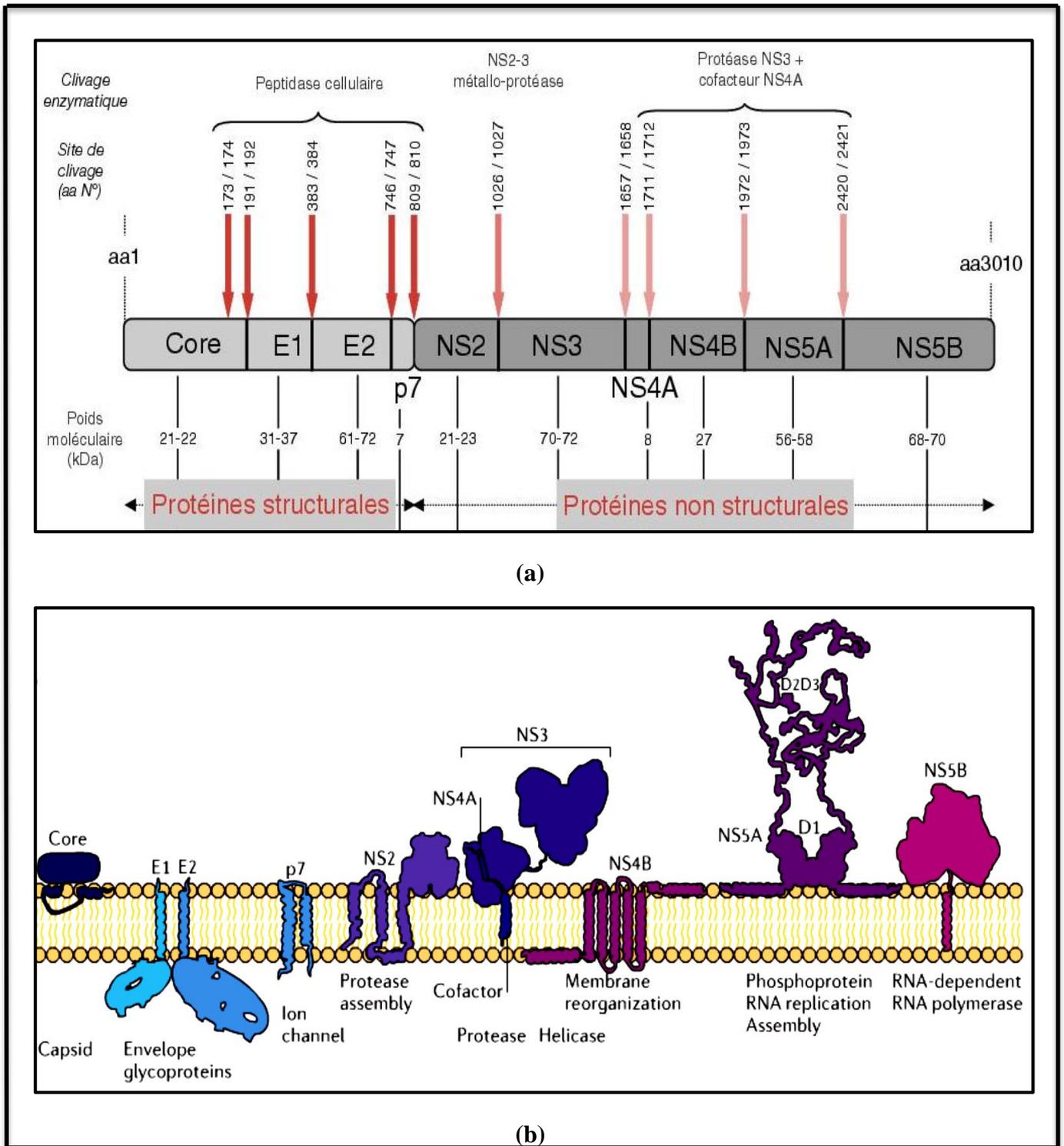


Figure 4 : Caractéristique des protéines virales.

(a) Localisation des gènes protéiques sur la séquence du génome viral avec caractéristique des protéines et sites de clivages enzymatiques et topologie membranaire des protéines virales clivées (d'après Jauffret-Roustide et al., 2009).

(b) Topologie membranaire des protéines virales clivées (**d'après Bartenschlager et al., 2004**).

3-4-1- La protéine capsid (Core) :

Durant la traduction de la poly-protéine, la protéine capsid, qui a la fonction d'assembler la nucléocapsid virale, est la première à être traduite. Cette protéine relativement bien conservée parmi les génotypes du VHC est retirée de la poly-protéine grâce au clivage à son extrémité C-terminale par une peptidase signal. La protéine capsid résultante, longue de 191 aa, est alors immature. La protéine mature de 21 kDa, longue de 173 à 179 aa est obtenue lorsque le peptide signal en C-terminal est clivé par une peptidase de peptide signal de la cellule hôte. C'est une protéine α -hélicoïdale ayant le comportement d'une protéine membranaire. Le domaine N-terminal (D1) contient une haute teneur en résidus basiques et est impliqué dans des interactions d'homo-oligomérisation et de liaison avec l'ARN. Le domaine C-terminal (D2) est nécessaire pour le repliement régulier du domaine D1 et est responsable du caractère membranaire de la protéine (**Boulant et al., 2006**). Cette protéine est attachée au Réticulum Endoplasmique (RE) ainsi qu'aux gouttelettes lipidiques et, dans de moindres proportions, au noyau et aux mitochondries. Cependant, dans un contexte de virus infectieux, elle a seulement été associée aux gouttelettes lipidiques, un compartiment d'entreposage de lipides neutres de la cellule entouré d'une couche de phospholipides qui proviendraient du bourgeonnement du RE (**Schwer et al., 2004 ; Rouille et al., 2006**).

En plus de former la nucléocapsid, la protéine capsid est impliquée dans la modulation du métabolisme des lipides ainsi que dans la carcinogénèse (**Ferguso et al., 2000 ; Savey et al., 2003**).

3-4-2- Les glycoprotéines E1 et E2 :

Les protéines de l'enveloppe virale E1 et E2, d'une masse moléculaire de 33 à 35 kDa et 70 à 72 kDa respectivement, sont relâchées de la poly-protéine par une peptidase signal. E1 et E2 sont des protéines transmembranaires avec un large ectodomaine contenant plusieurs sites de glycosylation bien conservés et un domaine transmembranaire en C-terminal. Ces glycoprotéines s'assemblent de façon non-covalente pour former un hétérodimère localisé au niveau du RE. Ce domaine transmembranaire C-terminal des protéines E1 et E2 est responsable de leur localisation de même que de leur hétérodimérisation. Ces deux protéines sont requises dans plusieurs étapes du cycle de réplication du VHC. Elles sont essentielles pour l'entrée du virus ainsi que pour l'assemblage de la particule virale. De plus, le fait que l'hétérodimère E1-E2 soit retrouvé à la

surface des particules virales suggèrent que E1 et E2 soient les ligands des récepteurs cellulaires nécessaires à l'entrée de la particule virale dans la cellule (Savey et al., 2003 ; Rouille et al., 2006).

La protéine E2 est la cible préférentielle de la réponse immune. Trois HVR ont été identifiées dans la séquence E2 : région la HVR1 est constituée 27 aa, La région HVR2 constituée de 9 aa et plus récemment la région HVR3 est comprise entre les régions HVR1 et HVR2 constituée de 35 aa. Cette dernière est moins variable que les deux autres. La région HVR1 est très conservée ce qui est cohérent avec le rôle qu'elle joue en tant que cible de la réponse immune et dans l'attachement de virus à la cellule (Callens et al., 2005).

3-4-3- La protéine p7 :

Dans la poly-protéine, la protéine p7 est située à la frontière des portions structurales et non-structurales mais sa maturation, comme les protéines structurales, est assurée par une peptidase signal. La protéine mature, qui contient deux domaines transmembranaires connectés par une boucle cytoplasmique, consiste en un polypeptide hydrophobique de 63 aa dont les extrémités N- et C-terminale font face à la lumière du domaine transmembranaire. Récemment, p7 a aussi été localisé à la mitochondrie. La protéine p7 ne s'avère pas nécessaire pour la réplication de l'ARN viral *in vitro* mais est essentielle pour permettre l'infection du virus dans les chimpanzés. Il a été démontré que p7 a la capacité de former des oligomères et des canaux ioniques, ce qui suggère qu'elle puisse avoir la fonction de viroporine, connue pour augmenter la perméabilité membranaire (Griffin et al., 2004).

3-4-4- La protéine NS2 :

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire de 21 à 23 kDa localisée au niveau du RE et dont on estime entre trois et quatre le nombre de domaines transmembranaires. Sa maturation est assurée, en N-terminal, par une peptidase cellulaire à l'intérieur du RE et en C-terminal, par son auto clivage avec la protéine NS3. Le clivage à la jonction NS2-3 requiert les 130 aa en C-terminal de NS2 et les 180 premiers aa de NS3, qui formeront ensemble la cystéine-protéase NS2/3. NS2_{pro} forme un dimère composé de deux sites actifs comprenant chacun les résidus des deux monomères, soit les résidus His143 et Glu163 de l'un complété par le résidu Cys184 de l'autre. La nécessité d'avoir un dimère pour former une protéase NS2/3 suggère que la concentration de NS2 puisse être un régulateur de la formation du complexe de réplication.

La protéine NS2 mature n'a pas de fonction déterminée mais elle est essentielle pour mener à bien le cycle complet de réplication du VHC. Puisque NS2 ne semble pas nécessaire à la réplication de

l'ARN, cela suggère que cette protéine soit impliquée dans l'assemblage ou le relâchement de la particule virale (**Moradpour et al., 2007**).

3-4-5- Le complexe NS3/4A :

Les protéines NS3 et NS4A, formant le complexe NS3/4A, sont sûrement les protéines les mieux caractérisées du VHC. NS3 est une protéine bi-fonctionnelle de 69 kDa essentielle à la maturation de la poly-protéine et à la réplication virale. Cette protéine est composée de deux domaines, le tiers N-terminal a une activité de type protéase à sérine (indépendamment de l'activité protéase NS2/3) alors que les deux tiers en C-terminal ont une activité hélicase à ARN et nucléotidase. Le domaine protéase a un repliement typique des protéases de la famille de la chymotrypsine. La triade catalytique, indispensable à l'activité protéase, est composée des résidus His57, Asp81 et Ser139 de la protéine NS3. L'activité protéase de NS3 est nécessaire à la maturation des protéines non-structurales virales. Cependant, une activité efficace de la protéase NS3 requiert la liaison non-covalente de son cofacteur, la protéine NS4A (**Li et al., 2005**).

Le domaine hélicase de NS3 est un membre de la superfamille des hélicases. Ces enzymes ont la capacité de coupler le déroulement de l'ARN double-brin ou des structures secondaires d'ARN simple-brin avec l'hydrolyse de l'Adénosine Tri-Phosphates (ATP). On sait que l'activité hélicase est nécessaire pour la réplication efficace de l'ARN viral, mais aucune fonction l'impliquant dans le cycle viral ne lui a été assignée. L'activité hélicase peut être modulée par l'interaction entre la protéase et l'hélicase ainsi que par la présence de NS4A. En effet, la protéine complète NS3 a une meilleure activité hélicase comparativement au domaine hélicase seul de NS3 (**Beran et al., 2007**).

NS4A est un polypeptide de 54 aa dont la portion centrale interagit avec NS3 et s'incorpore en son cœur, fournissant ainsi à la protéase un brin p qui permet son repliement adéquat. En plus d'assurer le repliement complet de NS3, NS4A induit un changement conformationnel qui repositionne la triade catalytique et stabilise aussi NS3 contre la dégradation catalytique. NS3, comme la majorité des protéines du VHC, est retrouvée en association avec les membranes du RE ou des membranes qui en sont dérivées lorsqu'elle est co-exprimée avec la protéine NS4A. Par contre, lorsqu'elle est exprimée seule, la protéase NS3 est diffuse dans le cytoplasme et le noyau. Le complexe NS3/4A a aussi été visualisé à la mitochondrie où il interférerait avec des voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire innée (**Li et al., 2005 ; Beran et al., 2007**).

3-4-6- La protéine NS4B :

La protéine NS4B est une protéine relativement hydrophobique de 27 kDa localisée à la membrane du RE arborant 4 domaines transmembranaire et deux hélices amphiphiles en N-terminal, dont la première serait responsable de sa localisation et de celle des autres protéines non-structurales du VHC. Un motif de liaison de nucléotides, situé dans une boucle cytoplasmique de NS4B, a une activité GTPase essentielle à la réplication virale (**Einav et al., 2004**).

La fonction de NS4B n'est pas tout à fait déterminée. Un de ses rôles serait de former le site de réplication virale en altérant les membranes du RE ou des membranes dérivées en une structure nommée réseau membranaire. NS4B peut s'homo-oligomériser et peut être palmitoylée à deux résidus en C-terminal, modifications qui faciliteraient son oligomérisation. Le rôle de cette interaction n'a pas encore été résolu mais pourrait être impliqué dans l'altération des membranes par NS4B (**Yu et al., 2006**).

3-4-7- La protéine NS5A :

La protéine NS5A est une protéine associée à la membrane composée d'une hélice amphiphile suivie de trois domaines. L'hélice amphiphile N-terminale de NS5A contient une surface hydrophobe riche en résidu tryptophane qui permet de l'ancrer parallèlement dans le plan de la membrane cytosolique ainsi qu'une surface hydrophile qui est probablement impliquée dans des interactions protéine-protéine essentielles à la formation d'un complexe de réplication fonctionnel. L'AH est responsable de l'association de NS5A avec le RE ou les membranes dérivées du RE, bien qu'une co-localisation avec les mitochondries et les gouttelettes lipidiques ait aussi été observée.

NS5A est une zinc-métallo protéine qui contient un motif de quatre cystéines conservées qui est absolument requis pour la réplication de l'ARN. NS5A a la capacité d'interagir avec les brins d'ARN positifs ou négatifs. À l'origine, NS5A avait soulevé beaucoup d'intérêts par son potentiel de moduler la réponse à l'interféron. D'ailleurs, le domaine II est ciblé comme candidat potentiellement impliqué dans l'inhibition de la Protéine Kinase R (PKR) qui peut normalement initier la réponse menant à la production d'interférons. Des études prouvent le caractère essentiel du domaine II de NS5A pour la réplication du VHC en démontrant, par mutagénèse, que plusieurs résidus de ce domaine sont requis pour que la réplication ait lieu. Le domaine III est une région qui a été qualifiée de hautement flexible génétiquement.

NS5A est essentielle pour la réplication virale et est retrouvée dans un état basal phosphorylé (56 kDa) ou hyper-phosphorylé (58 kDa). Au moins une kinase serait responsable de la phosphorylation de NS5A, il s'agit de la caséine kinase 1a. L'implication de la phosphorylation de

NS5A n'a pas encore été déterminée mais semble importante dans la modulation de la réplication de l'ARN de VHC. Des mutations affectant l'hyper-phosphorylation de NS5A favorisent la réplication (Quintavalle *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2006).

3-4-8- La protéine NS5B :

La protéine NS5B est une ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) de 68 kDa. Basée sur la structure classique d'enzyme de la forme de la main droite, la structure de la polymérase du VHC contient des motifs qui sont typiquement partagés par toutes les RdRp, tels les sous-domaines de la paume, des doigts et du pouce. L'oligomérisation de NS5B a été rapportée et il a été montré qu'elle est importante pour l'activité de synthèse de l'ARN. Comme la plupart des protéines du VHC, NS5B est associée avec la membrane du RE ou des membranes dérivées du RE. Un domaine transmembranaire, sous la forme d'une hélice α située dans les 21 derniers aa de la protéine, est responsable de la localisation de NS5B au RE. Il a été montré que cette hélice est nécessaire et suffisante pour cibler NS5B à la membrane du RE de même qu'essentielle à la réplication virale (Moradpour *et al.*, 2007).

3-4-9- La protéine F :

En plus du grand cadre de lecture codant pour la poly-protéine virale, le VHC contient un cadre de lecture alternatif qui chevauche la séquence de la protéine capsidique. Des études *in vitro* révèlent qu'un décalage traductionnel du ribosome ou « Frameshift » permettrait la traduction de la protéine ARFP aussi appelé protéine F (Frameshift) avec une efficacité de 1 à 2 %. Toutefois, le mécanisme traductionnel menant à la synthèse de la protéine F reste controversé et des sites d'initiation interne de la traduction ont également été identifiés. La détection d'anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine F chez les patients atteints d'une hépatite C confirme l'expression de la protéine F pendant l'infection et le déclenchement d'une réponse immunitaire. Toutefois, la protéine F ne s'avère pas requise pour la réplication virale *in vitro* et *in vivo* et son implication dans le cycle viral et la pathogénèse du VHC n'est pas déterminée (McMullan *et al.*, 2007).

3-5- Cycle viral :

Depuis la découverte du VHC, les études moléculaires réalisées ont permis de mieux comprendre les étapes du cycle viral, et plus particulièrement les étapes de traduction et de réplication de l'ARN viral. Cependant de nombreuses zones d'ombres persistent notamment dans les étapes précoces et tardives du cycle viral (Moradpour *et al.*, 2007).

Toutefois, les données obtenues jusqu'à ce jour permettent d'établir le cycle viral résumé dans la figure ci-après.

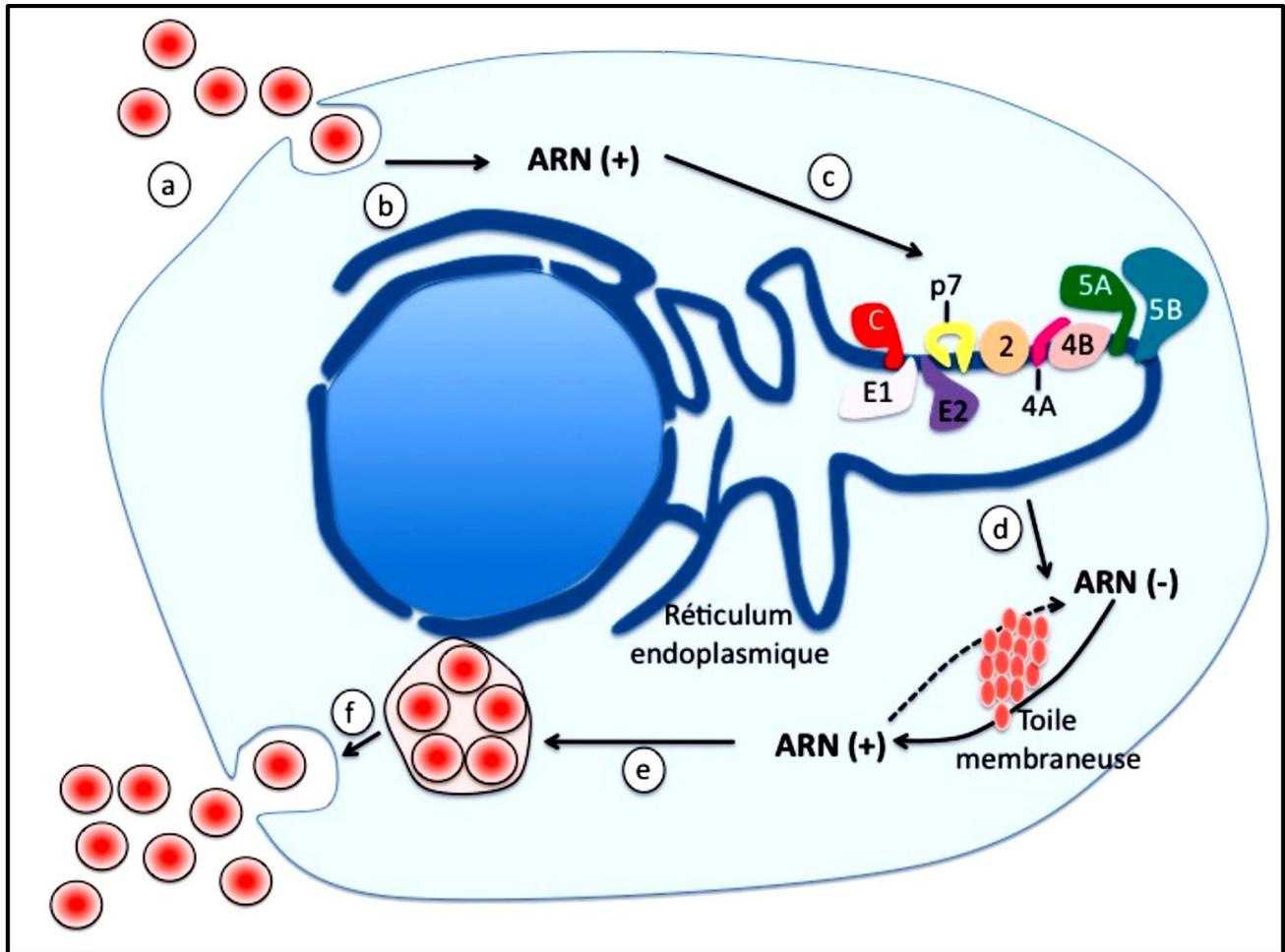


Figure 5 : Cycle de réplication du VHC (d'après Moradpour *et al.*, 2007).

a) Attachement du virus et entrée, **b)** Relâche au niveau du cytoplasme, **c)** Traduction de la polyprotéine, **d)** Réplication de l'ARN, **e)** Assemblage des virions, **f)** Maturation et relâche.

3-5-1- Entrée du VHC dans la cellule hôte :

Les études du VHC ont rapidement déterminé que seulement certaines lignées cellulaires, toutes dérivées des hépatocytes humains, peuvent en être infectées. Dans le but d'expliquer ce tropisme, plusieurs facteurs cellulaires ont été ciblés en tant que récepteurs ou co-récepteurs potentiels du VHC. Il existe des évidences de l'interaction du VHC avec les récepteurs des lipoprotéines de faible densité (Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR)), ce qui concorde avec l'observation de particules virales liées à des LDL et VLDL dans le sérum de patients infectés. D'autres molécules telles que le récepteur de l'asialo-glycoprotéine, la protéoglycane

d'héparane-sulfate et les lectines L-SIGN (Liver-Specific ICAM3-Grabbing Non integrin) et DCSIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non integrin) ont aussi été soupçonnées d'avoir un rôle dans l'entrée du virion dans la cellule (**Simmonds et al., 1993**).

Cependant, aucune de ces molécules ne semble nécessaire à l'introduction du VHC. De plus, comme L-SIGN et DC-SIGN ne sont pas exprimées sur les hépatocytes et ne peuvent donc pas servir de récepteur au virus, on leur a associé un rôle de capture et de transport des virions vers les hépatocytes. Dans cette section, trois facteurs cellulaires pour lesquels il existe de fortes évidences d'implication dans l'entrée du virus sont présentés (**Moradpour et al., 2007**).

Comme pour de nombreux virus, l'attachement du VHC à la surface des hépatocytes se fait d'abord de manière non spécifique et semble être médiée par des Glyco-Amino-Glycanes (GAG) et par le LDLR. Cependant, récemment il a été suggéré que l'interaction entre le VHC et le LDLR semble être impliquée dans une entrée non-productive qui peut potentiellement conduire à la dégradation de la particule virale.

Après la première fixation à la surface de la cellule, le virus se lie avec des facteurs d'entrée spécifiques. Il interagit d'abord avec le récepteur Scavenger de classe B et de type 1 (Scavenger Receptor B1 (SRB1)) puis avec CD81 grâce aux glycoprotéines d'enveloppe virales. CD81 et SRB1 sont les premières protéines à avoir été identifiées comme facteurs d'entrée. CD81 est une protéine de la famille des tetraspanines impliquées dans un grand nombre de fonctions cellulaires et SRB1 est un récepteur à multiples ligands qui est le récepteur majeur des HDL. Le virus est ensuite relocalisé vers les jonctions cellulaires possédant les protéines CLauDiNe-1 (CLDN1) et OCcLudiNe (OCLN). À l'heure actuelle, il n'existe aucune preuve indiquant que la particule virale interagit directement avec les protéines CLDN1 ou OCLN. Toutefois, il a été démontré que CLDN1 et CD81 peuvent interagir au niveau de la membrane plasmique, ce qui suggère que CLDN1 pourrait être un partenaire de CD81 comme récepteur du VHC. Le rôle exact d'OCLN dans l'entrée du VHC reste à déterminer.

Une fois localisé à la surface de la cellule, le virion est internalisé par endocytose médiée par les clathrines. Après l'internalisation, le virion est transporté vers les endosomes précoces, où la fusion des membranes sous l'effet d'un pH acide prend place. Ceci permet la libération de la capsid du VHC dans le cytosol (**Alter, 2005 ; Moradpour et al., 2007**).

3-5-2- Traduction virale :

Une fois la décapsidation réalisée, l'ARN génomique viral est libre dans le cytoplasme. L'ARN de polarité positive est pris en charge par la machinerie traductionnelle cellulaire puis

traduit en une poly-protéine de 3011 acides aminés. Il est estimé que 1000 molécules de poly-protéines sont traduites par génome de VHC (**Simmonds et al., 1993**).

Chez les eucaryotes, les ARNm (ARN messenger) sont traduits selon le modèle « scanning ». Ce modèle implique que l'initiation de la traduction se fait par la reconnaissance de la coiffe dans le 5'UTR de l'ARNm qui sert de « balise » pour le recrutement de la sous unité ribosomale 40S grâce à des protéines appelées facteurs d'initiation de la traduction eucaryotes (eukaryotic Initiation Factor (eIFs)). Contrairement aux ARNm dans les cellules eucaryotes, la traduction du VHC s'effectue par un mécanisme dépendant d'un IRES (**Suzuki et al., 2007**).

La traduction est initiée grâce à l'IRES au codon AUG en position 342, dans la région 5', où se fixent les sous-unités 40S des ribosomes. Le facteur eIF 3 se fixe à la fois à l'IRES et à la sous unité ribosomiale 40S pour former un complexe ternaire. À ce complexe ternaire se joignent l'eIF 2, l'ARN de transfert (ARNt) qui se fixe au niveau du site P de la sous-unité 40S et Guanosine Tri-Phosphates (GTP). Tous ces éléments réunis forment le complexe 48S appareillé au niveau du codon d'initiation de la traduction de l'ARNm. Après l'hydrolyse du GTP, le facteur eIF 2 se libère de l'ARNt initiateur et quitte le complexe. Une seconde hydrolyse du Guanosine Di-Phosphate (GDP) impliquant eIF 5 permet alors à la sous-unité 60S de rejoindre le complexe, formant le ribosome fonctionnel 80S. C'est ce ribosome qui amorce la traduction de la poly-protéine. Cette étape de traduction a lieu dans le RE rugueux. Bien qu'un nombre d'eIFs soit requis pour l'activité IRES, certaines protéines appelées ITAF (IRES Trans-Acting Factors) joueraient un rôle important dans cette traduction. Elles permettraient notamment de faciliter le recrutement de la machinerie traductionnelle ou de stabiliser la structure de l'IRES. Toutes ces protéines ont des domaines multiples se liant à l'ARN. Des études ont montré que la protéine La (Lupus antigen) stimule la traduction du VHC en interagissant avec une séquence proche de l'AUG initiateur de l'IRES. D'autres protéines comme les ribo-nucléoprotéines hétérogènes (heterogeneous Ribo-Nucleo-Protein (hRNP)) modulent la traduction du VHC (**Suzuki et al., 2007**).

En effet, la hRNP D active la traduction du VHC en se liant au domaine II de l'IRES. La protéine PTB (pyrimidine Tract-binding Protein), une autre hRNP, se lie au 5'UTR. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus en ce qui concerne son rôle dans la traduction du virus.

Les micro-ARN jouent aussi un rôle dans la traduction du VHC. En effet, miR-122 en se liant aux sites présents en 5'UTR stimule la traduction du VHC, possiblement en favorisant l'association des sous-unités ribosomales avec l'ARN virale à un stade précoce de l'initiation de la traduction. Une autre hypothèse est que miR-122 permettrait de stabiliser l'ARN viral. Récemment, deux autres micro-ARN, miR-199a et miR-196 ont été identifiés comme inhibiteurs de la traduction du virus lorsqu'ils sont surexprimés. De plus, les protéines virales auraient un rôle dans la modulation

de la traduction du VHC. Cependant les résultats obtenus sont controversés dus à la variété des systèmes rapporteurs utilisés (Simmonds *et al.*, 1993 ; Suzuki *et al.*, 2007).

3-5-3- Réplication de l'ARN viral :

Arrivé à un certain niveau d'expression de gènes viraux, la traduction est ensuite inhibée par un mécanisme encore non déterminé et la réplication du génome viral est initiée, une fois le génome dépourvu de l'ensemble des ribosomes. La réplication a lieu au niveau d'une structure membranaire dérivée du RE, la « membrane web ». L'initiation requiert la fixation d'un complexe de réplication sur l'extrémité 3'UTR de l'ARN, nécessaire comprenant des protéines virales (NS5A et NS5B) associées à certains protéines cellulaires telles les protéines NFAR qui permet la formation d'un pseudo-nœud et le déclenchement de la réplication. Celles-ci reconnaissent les ARN double brins et interagissent également avec l'extrémité 5'-UTR, permettant ainsi la constitution d'une boucle au niveau de l'ARN, nécessaire à l'initiation de la réplication par les protéines NS5A et NS5B.

La traduction virale tout comme la réplication de l'ARN viral, utilisent comme matrice l'ARN de polarité positive, montrant qu'il existe un processus qui permet de passer d'une étape à l'autre dans le cycle viral. Cependant ce mécanisme n'est toujours pas connu (Suzuki *et al.*, 2007).

Après la traduction, les protéines du VHC et certains facteurs cellulaires s'associent au niveau d'un réseau membranaire. Ce dernier est issu d'une accumulation de vésicules membranaires dérivées du RE et de gouttelettes lipidiques. La formation de ce réseau est induite par la protéine non-structurale NS4B en combinaison avec NS5A. Il a été montré que seule une petite fraction des protéines non structurales est associée au réseau membranaire réalisant la réplication. Le reste des protéines pourrait être utilisé pour contrecarrer le système immunitaire ou participer à la formation de virions infectieux. Ainsi, le CR du VHC se forme au niveau du réseau membranaire considéré comme un compartiment. Cette compartimentation permettrait de protéger l'ARN viral contre les défenses cellulaires lors de la réplication. La machinerie de réplication ainsi formée permet de répliquer l'ARN génomique du VHC. La réplication commence par la synthèse d'un ARN complémentaire de polarité négative (ARN(-)) en utilisant le génome viral comme matrice. Ensuite, ce brin négatif sert de matrice pour la synthèse des brins positifs (ARN(+)). Ces deux étapes sont catalysées par l'ARN polymérase ARN dépendante du VHC (NS5B), qui initie la synthèse au niveau du 3'UTR du génome. Les ARN(+) sont transcrits 5 à 10 fois plus que les ARN(-) (Bartenschlager *et al.*, 2003).

D'autres facteurs cellulaires modulent la réplication du VHC. Il y a des protéines du cytosquelette comme l'actine, ACTN1. Un grand nombre de kinases interagissent avec NS5A, telles que PDK-1 ou PI4KIIIa. PI4KIIIa est recrutée au site de réplication via une interaction membranaire avec NS5A et semble contribuer à l'intégrité du CR. Certaines protéines qui se lient directement à NS5A

ou NS5B jouent un rôle essentiel dans la réplication (**Bartenschlager et al., 2003 ; Suzuki et al., 2007**).

Les protéines VAP-A et VAP-B localisées dans le RE et au niveau de l'appareil de Golgi en sont deux exemples et seraient impliquées dans la formation du CR fonctionnel. De plus, il a été montré que la cyclophiline A qui interagit directement avec NS5A a un rôle essentiel dans la réplication de l'ARN du VHC. D'autres protéines, comme PTB qui se lie à l'ARN du VHC, participeraient aussi à la réplication virale. Différentes équipes ont aussi rapporté que des protéines impliquées dans l'autophagie telles que Beclin-1 ou ATG5 faciliteraient l'initiation de la réplication de l'ARN du VHC. De plus, ce processus cellulaire pourrait aussi contribuer à l'assemblage des particules virales (**Bartenschlager et al., 2003 ; Suzuki et al., 2007**).

3-5-4- Assemblage et libération :

Une partie des ARN(+) nouvellement synthétisés vont servir de génome aux nouveaux virions lors de l'étape de l'assemblage. Ces virus seront ensuite relâchés dans le milieu extracellulaire par la voie de sécrétion.

Le processus d'assemblage du VHC est l'étape du cycle viral la moins bien comprise. La morphogénèse du virus souligne la particularité du double rôle des protéines non-structurales à la fois dans la réplication et l'assemblage du virus. L'étape d'assemblage du VHC est étroitement connectée au métabolisme des lipides. En effet, les protéines structurales et non structurales du VHC interagissent avec des composants du métabolisme des lipides à des niveaux différents. Lors de l'infection par le VHC, il y a un profond changement dans la distribution intracellulaire des gouttelettes lipidiques. Ces dernières semblent jouer un rôle central dans l'assemblage du VHC puisque toutes les protéines virales ainsi que le génome viral sont accumulés à proximité de ces organelles. La protéine de capsid Core interagit directement avec les gouttelettes lipidiques et permet leur relocalisation. En plus de la protéine de capsid, certaines protéines non structurales virales comme NS3 et NS5A ont également été trouvées autour des gouttelettes lipidiques dans les cellules infectées par le VHC. La protéine NS5A apparaît comme un acteur central dans la transition entre la réplication et l'assemblage. En effet, un modèle propose que NS5A soit maintenue dans la fonction de réplication grâce à l'association avec des facteurs cellulaires, mais se dissocie lors de phosphorylations, ce qui conduit à l'assemblage des particules virales. Outre les protéines structurales virales et les composants du CR, les autres protéines du VHC, P7 et NS2, sont également essentielles pour la morphogénèse du VHC (**Bartenschlager et al., 2004 ; Moradpour et al., 2007**).

Le modèle largement admis aujourd'hui est le suivant : suite à l'accumulation de tous les composants viraux près des gouttelettes lipidiques, l'assemblage du virion peut commencer. Ce processus peut être divisé en trois étapes : la formation de la nucléocapside, le bourgeonnement et la maturation de la particule infectieuse. Trois éléments sont impliqués : la protéine Core, le complexe NS2 (comprenant NS2, les protéines d'enveloppe E1, E2, P7 et probablement NS3) et le CR. Le complexe NS2 et celui de la réplication se rejoignent. Ensuite la protéine Core induit la relocalisation des gouttelettes lipidiques créant un environnement favorable à l'assemblage. Puis le bourgeonnement viral est induit par la formation de la nucléocapside, par la formation de l'enveloppe par les glycoprotéines virales, et par l'accumulation de lipides au niveau du RE. Ceci permet la formation d'une lipo-viroparticule hybride qui est ensuite maturée. Au final, le virion a une composition lipidique VLDL-like et est associé à la protéine ApoE, ce qui est essentiel pour l'assemblage d'un virus infectieux (**Bartenschlager et al., 2004 ; Moradpour et al., 2007**).

4- Transmission :

La transmission du VHC se fait principalement par voie parentérale. Avant la mise au point de tests permettant de dépister le VHC, les dons de sang, les transfusions et les transplantations étaient les principaux modes de transmission (**Simmonds et al., 1993**).

Actuellement, dans le monde occidental la principale cause de transmission du VHC est la toxicomanie par voie intraveineuse. Plus de 60 % des infections sont liées à la consommation de drogues injectables. Cependant, dans les pays en développement, de mauvaises pratiques médicales seraient le principal risque de contamination. En effet, l'utilisation d'équipements mal stérilisés en Égypte, lors d'une campagne de lutte contre un parasite dans les années 60 à 80, est la cause d'un taux d'infection le plus élevé au monde (22 %). Toutefois, d'autres modes de transmission ont été décrits. Des transmissions nosocomiales lors d'utilisation de matériels chirurgicaux ou dentaires mal stérilisés ont été rapportées. L'acupuncture, les piercings, les tatouages ainsi que les contacts sexuels sont des causes de transmission du VHC même si ce dernier mode de contamination est rare. La transmission verticale, mère-enfant, est peu fréquente et se fait surtout lors de l'accouchement (**Dixit et al., 1995 ; Polyak et al., 1997**).

5- Évolution de la maladie et manifestations cliniques :

Les statistiques obtenues des études concernant la prévalence de l'infection au VHC dans le monde révèlent qu'approximativement 20 % des gens guériront spontanément de la maladie alors qu'environ 80 % développeront une infection chronique. Bien que l'évolution de la maladie reste imprévisible, l'infection chronique peut mener à une cirrhose du foie ou au carcinome hépatocellulaire. Le VHC serait responsable de 27 % de cirrhoses et de 25 % des CHC qui surviennent dans le monde, faisant du VHC une cause importante de maladies du foie nécessitant une transplantation hépatique (Perz *et al.*, 2006).

5-1- Infection aiguë :

Quand le VHC entre en contact avec l'organisme l'hépatite est appelée « aiguë ». La période d'incubation et sévérité de l'hépatite aiguë seraient liées à l'importance de l'inoculum. L'infection est souvent asymptomatique ou provoque des symptômes non-spécifiques de la maladie tels que de la fatigue, des malaises, de l'anorexie ou encore une perte de poids. Cette caractéristique de l'infection au VHC rend difficile l'étude de son développement à partir du moment de l'infection. La période d'incubation moyenne est de 2 semaines à 26 semaines (en moyenne 7 à 9 semaine). Lors d'une infection aiguë par le VHC, seul 20 à 30 % des patients présentent des signes cliniques, le plus souvent peu spécifiques (fatigue, nausées, douleurs de l'hypocondre droit suivies ou non de l'apparition d'urines foncées et d'un ictère). Environ 80 % des personnes présentent une hépatite aiguë an ictérique (avec peu au moins de symptômes) et 20 % ont hépatite ictérique (fatigue, nausée, perte de poids, douleurs du col de l'abdomen). En moyenne, environ 26 % des patients élimineront spontanément le virus, le plus souvent dans les 3 mois suivant les signes cliniques. Environ 70 % des personnes infectées vont évoluer vers une infection chronique (présence d'ARN du VHC détectable dans le sang plus de 6 mois).

Bien que l'ARN du virus puisse être détecté dans le sérum une à deux semaines après l'exposition, seulement un tiers des patients ressentent des symptômes, telle la jaunisse, et ce, entre 3 et 12 semaines après exposition. Durant les premières semaines de l'infection, on observe une rapide augmentation de l'ARN du VHC, suivie de l'apparition des symptômes et d'une impressionnante élévation du taux d'Alanine Amino-Transférase (ALT) dans le sérum, signe de nécrose et de dommages des hépatocytes. La majorité des patients développent des anticorps dirigés contre le VHC qui surgissent lors ou légèrement après l'apparition des symptômes. Il arrive que le taux d'anticorps produit soit variable ou très bas, voire indétectable chez les personnes immuno-déficientes (Hoofnagle, 2002 ; Alter, 2005).

5-2- Infection chronique :

Au moins 6 mois après l'infection et dans 80 % des cas, l'infection aiguë au VHC évolue en infection chronique. Le taux de chronicité de l'hépatite C varie avec l'âge, le sexe, la race et le statut du système immunitaire. Comme c'est le cas pour l'infection aiguë, le taux d'ARN viral augmente rapidement dans les deux premières semaines suivi également d'une élévation d'ALT dans le sérum. La plupart de patients atteints d'une infection chronique au VHC ne ressentent pas de symptôme spécifique, le plus commun étant la fatigue. D'autres symptômes peuvent être observés tels des nausées, de l'anorexie, des douleurs articulaires, des douleurs abdominales ou une perte de poids. Cependant, ces manifestations physiques ne sont souvent pas reliées immédiatement à l'hépatite, ce qui la rend difficile à diagnostiquer. Typiquement, durant la maladie, le taux d'ALT est variable et élevé mais peut aussi être normal, comme c'est le cas pour un tiers des patients. On remarque que les facteurs indiquant la maladie sont très variables d'une personne à l'autre et qu'il est difficile de généraliser les manifestations cliniques dues au VHC.

Une caractéristique qui semble distincte de l'infection est la présence d'inflammation causant la nécrose des cellules du foie qui peut être observée lors d'une biopsie du foie chez la plupart des personnes infectées. Cependant, la sévérité de l'inflammation varie considérablement d'une personne à l'autre (Martinot-Peignoux *et al.*, 1999 ; Cheney *et al.*, 2000).

5-3- Cirrhose du foie :

Durant les deux premières décennies suivant l'infection, 20 % des patients développeront une cirrhose du foie. L'apparence initiale de fibrose hépatique, une accumulation excessive d'une matrice extracellulaire de composition altérée, est un indice important pour le développement futur de la cirrhose. Malheureusement, chez plusieurs patients, l'infection reste asymptomatique jusqu'à ce que surgissent des complications liées à la cirrhose. Toutefois, plusieurs facteurs peuvent indiquer une prédisposition des individus à développer progressivement une cirrhose du foie. En fait, les gens infectés par le VHC après 50 ans, de sexe masculin ou consommant de grandes quantités d'alcool sont plus susceptibles de développer une cirrhose du foie (Poynard *et al.*, 1997).

5-4- Carcinome hépatocellulaire :

En 1994, le VHC a été classé comme un facteur cancérigène pour l'humain, menant les patients à développer un carcinome hépatocellulaire (CHC). Ce type de cancer du foie se manifeste en moyenne 2 à 3 décennies après le début de l'infection. La majorité des cas de CHC associés au

VHC surviennent chez les patients ayant développé une cirrhose du foie. En effet, il est bien établi que la cirrhose est un état préalable au cancer (**McGlynn et London, 2005**).

Toutefois, de rares cas de CHC ont été rapportés chez des patients ayant une hépatite chronique sans cirrhose. Le cancer du foie serait, selon certaines études, la principale cause de mortalité chez les patients ayant une cirrhose résultant de l'infection au VHC (**Sangiovanni et al., 2006**).

Depuis plus de 20 ans, on observe une hausse impressionnante de l'incidence des CHC dans la plupart des pays industrialisés. Il est généralement admis que cette augmentation serait due à la masse de personnes infectées au VHC, plusieurs décennies auparavant, qui a atteint le stade de cirrhose et qui développe subséquemment un cancer (**McGlynn et London, 2005**). Certains facteurs sont impliqués dans le développement d'un cancer. Dans les pays industrialisés, la consommation excessive d'alcool serait une cause majeure associée à la cirrhose et, par conséquent, au cancer. L'âge, le sexe et la co-infection VHB/VHC seraient également des paramètres épidémiologiques à considérer, les personnes d'âge avancé et de sexe masculin co-infectées étant plus à risque de développer un cancer du foie (**Ikeda et al., 2006**).

5-5- Manifestations extra-hépatiques :

D'autres complications de l'hépatite C chronique peuvent nuire et affecter la qualité de vie des personnes atteintes. L'infection chronique au VHC a été associée à plusieurs manifestations extra-hépatiques dont la cryoglobulinémie, les lymphomes non-hodgkiniens, la glomérulonéphrite et plusieurs autres. La pathogénèse de ces complications n'est pas encore résolue mais le fait qu'elles soient possiblement liées à l'infection au VHC peut aider à son dépistage chez les patients asymptomatiques (**Hoofnagle, 2002 ; Alter, 2005**).

6- Dépistage :

Un problème rencontré dans le domaine de l'hépatologie au 20^e siècle était l'absence de moyen pour détecter la présence du VHC chez les individus. Dès lors, des tests permettant le diagnostic du virus ont été développés et sont maintenant disponibles.

6-1- Détection d'anticorps anti-VHC :

La présence d'anticorps anti-VHC dans le sérum est détectée par l'usage d'un test d'immuno-buvardage enzymatique de troisième génération qui détecte des anticorps dirigés contre les divers épitopes du VHC. La première génération de ce genre de test a permis de diminuer considérablement la transmission du virus par le sang et, par conséquent, de diminuer l'incidence

des hépatites post-transfusionnelles. Brièvement, le test consiste à utiliser des antigènes recombinants pour capturer les anticorps anti-VHC.

La présence de ces anticorps est révélée par colorimétrie suite à leur marquage avec des anticorps couplés à une enzyme catalysant une réaction produisant de la couleur. La spécificité de ces tests a grandement été améliorée et la spécificité obtenue avec le test de troisième génération est maintenant de plus de 99 %. Ce test a l'avantage d'être disponible, facile d'utilisation, reproductible entre les laboratoires et de coût relativement bas. Néanmoins, l'obtention de faux-positifs peut parfois survenir. Dans certains cas, incluant les patients ayant un taux normal d'ALT, souffrant de cryoglobulinémie ou simplement lorsqu'un doute subsiste quant au diagnostic, une confirmation est nécessaire. Pour ce faire, un test d'immuno-buvardage recombinant consistant à détecter les anticorps dirigés contre le VHC sur une membrane de nitrocellulose peut être effectué. Un inconvénient du test de détection d'anticorps chez les patients est qu'il s'avère impossible de détecter les anticorps contre le VHC dans les cas d'infection aiguë précoce ou chez les individus immuno-déficients. Dans ces cas-là, il est nécessaire de déterminer s'il y a présence du virus en détectant l'ARN du VHC en circulation (**Colin et al., 2001 ; Pawlotsky, 2002**).

6-2- Détection et quantification de l'ARN viral :

La détection directe de l'ARN viral dans le sérum est une méthode de choix pour le dépistage d'une infection au VHC. L'ARN du VHC devient détectable dans la semaine suivant l'infection, quoique parfois en petite quantité dans le sérum. C'est pourquoi la méthode fréquemment utilisée est l'amplification en chaîne par polymérisation (Polymerase Chain Reaction (PCR)), qualifiée comme étant hautement sensible et spécifique, mais coûteuse comparativement au test de détection des anticorps. Pour étudier les différentes corrélations existant entre la quantité d'ARN viral dans le sérum et les divers aspects de la maladie (résistance au traitement, virulence du VHC), il est possible d'estimer la charge virale par la technique de PCR en temps réel. Il semblerait que les patients ayant une grande charge virale soient plus infectieux et résistants au traitement (**Cheney et al., 2000**).

6-3- Biopsie du foie :

Le niveau d'ALT et la présence d'ARN viral ne permettent pas de déterminer l'ampleur de la maladie. Dans cette optique, l'usage de la biopsie du foie s'avère un outil essentiel pour établir la sévérité de la maladie, afin de guider la thérapie chez les patients chroniquement infectés par le VHC et procurer des informations indispensables sur le pronostic, telles que le degré d'inflammation et la quantité de fibrose présente (**Cheney et al., 2000**).

7- Traitements et vaccination :

À l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin contre le VHC. Le traitement standard contre l'hépatite C est une combinaison d'interféron alfa pégylé et de ribavirine. La durée du traitement est de 24 semaines en cas d'infection avec les génotypes 2 et 3, alors qu'elle est de 48 semaines pour les infections avec les génotypes 1, 4, 5 et 6. Récemment, l'efficacité du traitement a été augmentée de 50 % à 70 % lorsque la première génération d'inhibiteurs de protéase virale (Telaprevir ou Boceprevir) a été ajoutée. Cependant, l'efficacité de cette nouvelle formule reste dépendante du génotype du VHC et des mutants de résistance apparaissent. Le traitement est coûteux, à de forts effets secondaires et ne peut pas être utilisé lors de la grossesse. Ceci souligne la nécessité de générer de nouveaux antiviraux. On parle d'antiviraux DAA (pour Direct Acting Antiviral) ciblant les protéines virales, et d'antiviraux HTA (Host Targeting Antiviral) inhibant la fonction de protéines cellulaires ayant un rôle dans le cycle viral du VHC (**Chmielewska et al., 2015 ; Walker et Grakoui, 2015**).

8- Variabilité génétique du VHC :

8-1- Méthodes de typage du VHC (génotypes et sous-types) :

Le point crucial pour toutes les techniques de typage est le choix de la région à analyser. En effet, cette région doit, d'une part, présenter suffisamment de variabilité pour être spécifique du type et du sous-type à analyser et, d'autre part, sa variabilité doit être suffisamment faible pour permettre l'amplification de tous les génotypes. Les régions du génome les plus utilisées sont : la région 5' UTR, la capsid et la région NS5B (**Suzuki et al., 2007**).

8-1-1- Séquençage : le séquençage après clonage est la technique de référence et est effectué dans différentes régions du génome viral, le plus souvent les régions NS5B, E1 et la capsid. Ces séquences servent de référence à la constitution des arbres phylogéniques permettant de classer les isolats en types et sous-types. Les séquences ainsi identifiées sont comparées aux séquences enregistrées dans les différentes banques de données (**Suzuki et al., 2007**).

8-1-2- PCR spécifique de type : cette technique consiste en une amplification de la région de la capsid du VHC au moyen de plusieurs couples d'amorces spécifiques de types et sous-types donnant des séquences d'amplification de taille variable en fonction des génotypes. Simple mais fastidieuse, elle nécessite la réalisation d'une amplification par sous-type (**Suzuki et al., 2007**).

8-1-3- Etude du polymorphisme de restriction : l'étude par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste à réaliser une amplification d'une région donnée du génome du VHC (le plus souvent les régions 5'UTR et NS5B), suivie d'une coupure du produit d'amplification à l'aide de plusieurs enzymes de restriction, puis la séparation de ces fragments par électrophorèse. Le choix approprié des combinaisons d'enzymes permet d'obtenir des fragments de taille variable caractéristique de type ou de sous-type. Cette technique, peu onéreuse, permet de différencier dans 80 % des cas les sous-types du VHC (Suzuki *et al.*, 2007).

8-1-4- Hybridation inverse : cette technique consiste en une amplification de la région 5' UTR du VHC, puis en une hybridation des produits d'amplification avec des sondes nucléotidiques spécifiques des différents types et sous-types. Ces sondes sont soit immobilisées sur bandelette de nitrocellulose, soit fixées dans des puits d'une micro-plaque. L'hybridation est ensuite révélée par une méthode colorimétrique enzymatique. Cette technique, de réalisation simple, utilisable sur le produit RT-PCR, est très informative pour la détermination des types et sous-types dans près de 96 % des cas. Elle présente deux inconvénients : son prix relativement élevé, et ses limites dues au choix de la région amplifiée (5' UTR) : spécifique pour le type, mais pas pour le sous-type. Malgré ces limites, c'est la technique actuellement la plus utilisée dans les études cliniques (Suzuki *et al.*, 2007).

8-1-5- Sérotypage : le sérotypage repose sur une détection d'anticorps dirigés contre les épitopes spécifiques et non sur des séquences nucléotidiques. Il ne nécessite donc pas d'amplification génique. Le sérotypage recourt à des techniques simples telles que des tests de type ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ou Immunoblot. Ces techniques présentent pour l'instant des inconvénients : un manque de sensibilité (10 % à 25 % des sérums ne sont pas typables), l'impossibilité d'identifier les sous-types. Cependant, leur coût est faible, elles sont d'utilisation simple et peuvent typer des sérums ayant subi une rupture de la chaîne du froid (causant la destruction de l'ARN et ne permettant pas la détermination du génotype) (Dixit *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 2007).

8-2- Méthodes de typage du VHC (quasi-espèce) :

Toutes les méthodes d'analyse de la quasi-espèce du VHC passent par une transcription inverse (reverse transcription ou RT) suivie d'une amplification par PCR.

8-2-1 Séquençage en nucléotides : La séquence nucléotidique du produit viral amplifié peut être déterminée. Le séquençage direct ne permet de détecter que la population virale majoritaire.

La méthode de référence pour l'étude des quasi-espèces est donc le séquençage après clonage. Cette technique est la plus informative, mais elle reste difficile à mettre en œuvre pour de grandes séries d'échantillons. Différentes étapes ont permis de déterminer plusieurs régions hypervariables du génome du VHC. En particulier, un domaine appelé HVR1 situé dans la partie N-terminale de la protéine E2 a été séquençé (Weiner *et al.*, 1991).

8-2-2 Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) : Cette technique repose sur les modifications de conformation tridimensionnelle d'un brin d'ADN induites par une variation de séquence nucléotidique. Les fragments d'ADN sont dénaturés à 94°C et séparés par électrophorèse. Toutes les altérations (mutations, délétions ou addition de nucléotides) conduisent à une modification de l'ADN simple brin qui migre alors différemment de l'ADN sauvage. Cette technique a été utilisée par de nombreux auteurs pour déterminer les quasi-espèces du VHC et il est admis que le nombre de bandes d'ADN révélées reflète bien les variants de la quasi-espèce (Simmonds *et al.*, 2005 ; Suzuki *et al.*, 2007).

8-2-3- Heteroduplex Gel Shift (HGS) : Il est possible d'hybrider le produit d'amplification viral avec des amorces oligo-nucléotidiques. Les hybrides sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant suivie d'autoradiographie. Un hybride identique (séquence virale identique à celle de l'amorce) forme un homoduplex qui migre à une position caractéristique sur le gel, alors qu'un hybride non identique forme un hétéroduplex (séquence virale différente de celle de l'amorce) qui a une migration différente. La distance entre les bandes est proportionnelle au degré de divergence des séquences nucléotidiques. Par cette méthode, la diversité (distance entre 2 bandes appelée distance génétique) et la complexité (nombre de bandes appelé l'hétérogénéité de la quasi-espèce) génétiques peuvent donc être estimées. Cette méthode a été utilisée pour analyser la quasi-espèce du VHC : ses résultats sont corrélés à ceux du séquençage nucléotidique (Simmonds *et al.*, 2005 ; Suzuki *et al.*, 2007).

8-3- Implications cliniques et épidémiologiques de la variabilité génétique :

8-3-1- Génotypes :

La relation entre les génotypes du VHC et la progression de la maladie hépatique reste débattue. Une association entre génotype 1b et cirrhose ou cancer du foie a été montrée dans différentes études. Cependant, cette association semble être, au moins en partie, liée à des facteurs confondants comme la source et la durée de l'infection, ou encore l'âge au moment de l'infection.

En effet, le génotype 1b est associé à une source de contamination transfusionnelle, à une longue durée d'infection et à un âge avancé. Ainsi, le génotype 1b n'est pas associé de manière significative à la cirrhose ou au cancer du foie. Néanmoins, quelques études plaident en faveur du rôle plus pathogène du génotype 1b. Ainsi, des investigations sur la réinfection des greffons hépatiques par le VHC ont mis en évidence une association entre le génotype 1b et une hépatite chronique plus active avec un risque plus important d'évolution vers la cirrhose (**Chmielewska et al., 2015 ; Walker et Grakoui, 2015**).

Cependant, d'autres études n'ont pas retrouvé cette corrélation, et l'association entre génotype 1b et une hépatite plus sévère sur le greffon demeure controversée. D'autres travaux suggèrent que le génotype 1b, par des effets oncogéniques, favoriserait la survenue du cancer du foie. Une étude japonaise a montré que les malades infectés par le génotype 1b avaient un risque de développer un cancer du foie 3,8 fois supérieur à ceux qui sont infectés par le génotype 2a. Une étude italienne a montré que chez les malades atteints de cirrhose avec carcinome hépatocellulaire, le génotype 1b était le plus fréquent, et que leur âge moyen était inférieur à celui des malades avec carcinome hépatocellulaire infectés par un génotype non-1b. Un effet carcinogène propre de la capsid du VHC a été récemment mis en évidence chez des souris transgéniques. Cependant, la distribution des génotypes du VHC n'est pas différente entre les malades porteurs chroniques « asymptomatiques » du VHC à aminotransférases normales et les malades atteints d'hépatite chronique à aminotransférases élevées. Aussi, le fait que le génotype 1b soit le plus fréquent chez les malades à aminotransférases normales est contre un rôle plus pathogène de ce génotype, puisque ce groupe particulier de malades a habituellement des lésions hépatiques minimales (**Chmielewska et al., 2015 ; Walker et Grakoui, 2015**).

a- Réponse au traitement Interféron :

Le traitement de l'hépatite chronique C par l'interféron alpha permet d'obtenir une réponse avec normalisation de l'activité sérique des aminotransférases et négativation de l'ARN du VHC sérique chez moins de 50 % des malades définis comme « répondeurs ». À l'arrêt du traitement, plus de la moitié des répondeurs rechutent et moins de 20 % des malades développent une réponse prolongée avec une clairance de l'ARN VHC sérique et hépatique. Plusieurs études ont identifié des caractéristiques pré-thérapeutiques associées à une bonne réponse au traitement. Un des facteurs les plus importants est le génotype. Ce dernier est plus prédictif de la réponse prolongée que de la réponse en fin de traitement. Différentes études ont montré un taux faible de réponse au traitement avec le génotype 1 (a et b) alors que les génotypes 2 et 3 étaient associés à une meilleure chance de réponse.

La valeur prédictive du génotype paraît être indépendante des autres facteurs prédictifs de réponse que sont le sexe, l'âge, la source de l'infection, le degré de la fibrose, ou la présence d'une cirrhose. La valeur prédictive du génotype paraît être aussi indépendante de la charge virale. La valeur prédictive du génotype non 1 est proche de celle d'une charge virale faible et meilleure que celle de l'absence d'une cirrhose (**Chmielewska et al., 2015 ; Walker et Grakoui, 2015**).

b- Génotypes et pratique clinique :

La connaissance du génotype n'est pas utile pour déterminer le pronostic puisqu'il n'y a pas d'association clairement démontrée entre le génotype 1 et le risque supérieur de développement de cirrhose ou de cancer. Le pronostic de la maladie hépatique est apprécié principalement par la ponction-biopsie hépatique. Par contre, la connaissance du génotype est utile pour évaluer la probabilité de réponse au traitement. À l'échelon individuel, l'indication du traitement dépend principalement de la sévérité des lésions histologiques. Connaître le génotype est utile dans les cas difficiles, comme chez les personnes âgées, les malades avec cirrhose ou présentant une autre pathologie. Dans ces cas, le génotype (avec la charge virale) en permettant d'apprécier la probabilité de réponse, peut aider à déterminer le rapport bénéfice-risque. Par ailleurs, le génotype (avec la charge virale) est indispensable pour déterminer la durée optimale du traitement : 6 mois en cas de génotype 2 ou 3 ou de génotype 1 avec faible charge virale, 12 mois de traitement en cas de génotype 1 avec charge virale forte si le malade est répondeur (PCR négative à 6 mois de traitement) et si la tolérance le permet (**Martinot-Peignoux et al., 1999 ; Sobesky et al., 1999**).

8-3-2- Quasi-espèce :

Plusieurs études récentes ont suggéré que la quasi-espèce pourrait participer à la persistance du VHC, à la sévérité de la maladie hépatique et à la résistance au traitement.

a- Compartimentalisation :

La quasi-espèce circulant dans le sérum ne reflète pas nécessairement la quasi-espèce présente dans le foie ou les lymphocytes. Différentes équipes ont observé que la population quasi-espèce est de taille plus importante dans le foie que dans les autres compartiments : sérum, lymphocytes. Le foie étant le site majeur de la réplication du VHC, il paraît logique qu'un plus grand nombre de variants y soit trouvé. Les domaines hypervariables appartiennent aux régions E1 et E2 qui codent les protéines d'enveloppe. Cette grande variabilité génétique du VHC au niveau des protéines d'enveloppe lui permet probablement d'échapper à la réponse immunitaire et ainsi favoriser le passage à la chronicité de l'infection (**Martell et al., 1992 ; Pawlotsky, 2002**).

Cette hypothèse est soutenue par le fait que pour d'autres virus, les mutations antigéniques permettent d'échapper à la réponse immunitaire. Logiquement, une réplication importante, et donc une activité importante de l'ARN polymérase, entraîne de nombreuses mutations. Or il n'a pas toujours été mis en évidence de corrélation nette entre charge virale et variabilité virale. Théoriquement, plus une infection est ancienne, plus les mutations sont accumulées. Cependant, certains variants viraux apparaissent alors que d'autres disparaissent au cours du temps dans un processus dynamique perpétuel (Martell *et al.*, 1992 ; Pawlotsky, 2002).

Ainsi, il n'a pas toujours été clairement observé de corrélation entre durée de l'infection et variabilité virale. Il est possible que plus le volume de l'inoculât contaminant est important (transfusion sanguine) plus la probabilité d'avoir une quasi-espèce de grande taille est élevée (Martell *et al.*, 1992 ; Pawlotsky, 2002).

b- Sévérité de l'hépatopathie :

Un simple changement nucléotidique dans une région non-codante peut suffire pour augmenter la virulence d'un virus. Certains arguments suggèrent une association entre variabilité du VHC et sévérité de la maladie hépatique. En effet, dans les maladies sévères du foie, un nombre important de variants circulants a été mis en évidence. Une étude n'a pas retrouvé cette corrélation. Par ailleurs, une corrélation entre la variation des séquences nucléotidiques (région core du VHC) et l'existence d'une activité sérique élevée des aminotransférases a été rapportée. Les malades à aminotransférases normales auraient une plus faible variabilité virale. Les mécanismes responsables de l'association entre variabilité génétique et sévérité de la maladie hépatique ne sont pas connus. La maladie est le résultat d'une interaction entre facteurs viraux et facteurs liés à l'hôte. Dès lors, une première hypothèse pourrait être qu'une variabilité importante pourrait induire une réponse immunitaire plus importante et donc une maladie hépatique plus sévère. Il est également possible que le nombre élevé de variants de la quasi-espèce ne traduise que l'importance de la réponse immunitaire et ne soit pas à l'origine de celle-ci (Asselah *et al.*, 1999).

c- Résistance au traitement

La responsabilité de certains mutants dans la résistance aux traitements antiviraux a déjà été montrée pour d'autres virus et en particulier pour le virus de l'hépatite B. Plusieurs études récentes ont montré que la variabilité du VHC est elle aussi associée à la réponse au traitement par l'interféron. Néanmoins, pour toutes ces études reliant une grande variabilité génétique à une mauvaise réponse au traitement. Sa faible valeur prédictive ne permet pas de s'en servir comme aide à la décision pour instaurer un traitement à l'échelon individuel (Gonzalez-Peralta *et al.*, 1997).

L'hypothèse proposée pour expliquer cette résistance au traitement chez les malades ayant une population quasi-espèce de taille importante est la sélection de certains mutants variants due à la pression du système immunitaire (favorisée par le traitement interféron). Cette sélection favoriserait l'émergence d'une population résistante après traitement. Un grand nombre initial de variants pourrait augmenter la probabilité de survenue d'un clone viral résistant à l'interféron. Les mécanismes précis de résistance de certaines souches virales à l'interféron demeurent actuellement inconnus (**Gonzalez-Peralta et al., 1997**).

d- Stratégie pour l'établissement d'un vaccin :

L'approche pour la réalisation de vaccins doit tenir compte de la variabilité génétique. Il semble que dans le cas de l'infection par le VHC, des anticorps neutralisants soient produits. Cependant, ces anticorps dirigés contre des protéines virales, et en particulier les glycoprotéines de surface, ne semblent pas protéger nécessairement contre une nouvelle infection. Des mutations avec apparition de nouvelles variantes favorisent l'échappement aux anticorps neutralisants. Ainsi, des études rétrospectives sur des chimpanzés infectés par le VHC ont montré que des infections aiguës répétées pouvaient survenir chez un même animal. Une autre stratégie pourrait être d'immuniser avec des protéines ayant des séquences plus conservées entre différents géotypes comme la nucléocapside. Des travaux récents suggèrent que le site de pénétration du VHC dans les cellules (hépatocytes, lymphocytes B) pourrait être le CD 81. C'est une molécule transmembranaire de 25 kDa présente dans de nombreuses cellules (hépatocytes, cellules épithéliales, cellules hématopoïétiques). La boucle extracellulaire majeure de CD81 lierait la protéine d'enveloppe E2 du VHC. En effet, des protéines recombinantes contenant la boucle extracellulaire majeure de CD81 lient le VHC. De plus, des anticorps qui neutralisent l'infection VHC *in vivo* inhibent la liaison de CD81 avec la protéine d'enveloppe E2 du VHC. Néanmoins, la large distribution cellulaire de CD81 va contre le rôle de potentiel récepteur du VHC, n'expliquant pas l'hépatotropisme de ce virus (**Chmielewska et al., 2015 ; Walker et Grakoui, 2015**).

Chapitre II

Carcinome hépatocellulaire

1- Définition :

Le CHC est une tumeur épithéliale maligne développée à partir des cellules parenchymateuses hépatiques ; pour cette raison, les cellules tumorales ont des caractéristiques histologiques ressemblant à celles des hépatocytes. C'est le plus fréquent des cancers primitifs du foie, se développe habituellement sur une cirrhose, plus rarement sur une hépatopathie chronique non cirrhotique et exceptionnellement sur un foie sain (**Deugnier et al., 1990**).

Les caractéristiques anatomo-pathologiques et les signes cliniques du cancer du foie furent décrits à la fin du 19^{ième} siècle. En 1901, **Eggel** proposa une première classification du cancer du foie. En 1911, **Yamagiwa** précisa les caractéristiques histologiques des tumeurs du foie et distingua le CHC du carcinome des voies biliaires intra-hépatiques qu'il désigna respectivement sous les termes d'hépatome et de cholangiome. La signification du mot hépatome étant finalement ambiguë (les termes d'hépatome bénin et d'hépatome malin étant largement utilisés), l'International Association for the Study of the Liver (IASL) a recommandé les termes de carcinome hépatocellulaire et de carcinome cholangio-cellulaire (cholango-carcinome) (**Bruix et Sherman, 2005**).

2- Épidémiologie :

Le CHC représente 85 à 90 % de l'ensemble des tumeurs du foie. Avec environ 750 000 nouveaux cas en 2012 dans le monde, il est donc considéré comme l'un des cancers les plus fréquents. Dans 70 à 90 % des cas, il survient dans le cadre d'une pathologie hépatique chronique ou d'une cirrhose. Un tiers des patients cirrhotiques vont développer un CHC dans leur vie. Une étude en 2008, qui a estimé l'incidence et la mortalité de 27 cancers dans 182 pays, a montré que le CHC était le 5^{ième} cancer le plus fréquent en termes d'incidence chez l'homme et le 7^{ième} chez la femme. Environ 700 000 personnes sont décédées en 2008 dans le monde d'un CHC (**GLOBOCAN, 2008 ; 2012**).

Le CHC n'est pas uniformément réparti dans le monde entier. La plupart des cas (> 80 %) surviennent en Afrique sous-saharienne ou en Asie de l'Est (incidence supérieure à 20 cas pour 100 000 habitants par an). La Chine représente à elle seule plus de 50 % des cas dans le monde (taux d'incidence normalisé selon l'âge : les hommes, 35,2/100 000 ; femmes, 13,3/100 000). Les régions à risque intermédiaire sont l'Italie, l'Espagne, la Grèce (incidence de 10 à 20 cas pour 100 000 habitants par an) et les régions à faible risque sont l'Europe du Nord, l'Amérique du Nord, l'Amérique du sud et l'Océanie (une incidence inférieure à 5 cas pour 100 000 habitants par an) (**El-Serag et al., 2000 ; 2003 ; 2007**).

L'incidence des CHC varie aussi considérablement entre les différentes populations vivant dans la même région. Par exemple, en Asie, les taux d'incidence de CHC peuvent aller de 7,8/100 000 chez les hommes Indiens et 21,2/100 000 chez les hommes chinois (1993 à 1997). Et aussi pour les femmes : 5,1/100 000 chez les Chinoises et 1,8/100 000 chez les Indiennes. Un autre exemple, aux États-Unis, les taux d'incidence de CHC sont deux fois plus élevés chez les Asiatiques (sauf les Japonais) par rapport aux Africo-Américains, en sachant que ces derniers ont déjà un taux d'incidence des CHC plus élevés par rapport aux Européen-Américains. Mais il faut remarquer que ces variations ethniques peuvent aussi être causées par les différents facteurs de risque dans les différentes populations (**El-Serag et al., 2000 ; 2003 ; 2007**).

Le cancer du foie est le cinquième cancer le plus fréquent chez les hommes (554 000 cas, 7,5 % du total) et le neuvième chez les femmes (228 000 cas, 3,4 % du total), avec des ratios hommes / femmes entre 2/1 et 4/1 (**GLOBOCAN 2012**). Les raisons de taux plus élevés de cancer du foie chez les hommes peuvent s'expliquer par des différences d'exposition aux facteurs de risque selon le sexe. Mais des facteurs endogènes pourraient aussi contribuer à cette disparité tels que les facteurs hormonaux (androgènes et œstrogènes). Ces résultats proviennent des études épidémiologiques qui suggèrent qu'à long terme l'utilisation de contraceptifs oraux et de stéroïdes anabolisants androgènes peuvent induire des tumeurs hépatocellulaires bénignes et malignes (**El-Serag et al., 2000 ; 2003 ; 2007**).

L'incidence du CHC est en augmentation dans les pays développés, due au pic de cancers dus aux infections virales C contractées il y a 20 à 30 ans. D'autre part, l'amélioration des traitements des complications autres des cirrhoses (infections, hémorragies...) et enfin la forte augmentation des stéato-hépatites non alcooliques associées au syndrome métabolique. L'obésité, dont la fréquence est passée de 8,6 % en 1997 à 13 % en 2006 dans la population européenne est en effet devenu un « nouveau » facteur de risque de CHC (**Parkin et al., 2002**).

Les incidences du cancer primitif du foie sont très élevées en Afrique noire, sub-saharienne (30 cas pour 100000 habitants par an), et en Asie du sud-est (35 cas pour 100000 habitants par an), où le CHC est étroitement lié à l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB), qui représente le premier facteur de risque dans le monde (**Szklaruk et al., 2003**).

En Afrique de l'ouest, l'incidence du CHC est variable, faible au Nigéria (8,2 pour 100000 hommes par an), très élevée en Gambie (39,67 pour 100000 habitants par an, élevée au Mali (34,56 pour 100000 habitants par an). Cette variabilité est observée de même chez les femmes (**Ferlay, 2001**). Au Sénégal, cette incidence n'est pas définie. Elle serait proche de celle de la Gambie. Cependant 4 à 6 % des malades hospitalisés souffrent de CHC soit 150 cas/an (**Faye, 2002**).

Le CHC présente d'importantes variations géographiques et raciales. Les études de populations migrantes ont montré que celles-ci conservaient un risque correspondant à leurs pays d'origine, mais qu'il existait une modification de ce risque avec les générations suivantes. Ceci suggère que le risque de CHC pour un groupe ethnique donné dépend étroitement de l'exposition à des facteurs environnementaux pendant les premières années de la vie (en particulier l'exposition au virus de l'hépatite) (Mc Glynn, 2005).

À la différence des pays de forte endémicité, où l'incidence a tendance à diminuer, plusieurs études récentes ont rapporté une forte augmentation de l'incidence du CHC en Amérique du nord, et en Europe depuis deux décennies. Cette augmentation concerne surtout les hommes (qui représentent la grande majorité des malades atteints de CHC) mais aussi, à un moindre degré, les femmes. La tranche d'âge de 45 à 54 ans est principalement concernée. Il existe deux raisons principales pour expliquer cette augmentation d'incidence dans les pays occidentaux : d'une part, un grand nombre de malades infectés par le VHC dans les années 1970 arrivent maintenant au stade de cirrhose et sont donc exposés au risque de développer un CHC. D'autre part, la meilleure prise en charge des autres complications de la cirrhose, notamment l'hémorragie digestive par rupture de varices œsophagiennes a probablement abouti à une prolongation de la survie des malades. L'augmentation d'incidence devrait se poursuivre pendant au moins encore une quinzaine d'année à moins que l'amélioration de l'efficacité des interventions thérapeutiques, notamment les traitements antiviraux, ne modifie cette évolution (El-Serag *et al.*, 2000 ; 2003 ; Stokkeland *et al.*, 2006).

3- Étiologie du CHC :

Le CHC est probablement l'une des tumeurs dont on connaît le mieux les agents étiologiques. Il s'agit principalement de l'infection chronique par les VHB et VHC, l'exposition à l'Aflatoxine B1 (AFB1), la consommation excessive d'alcool, certaines maladies génétiques métaboliques. Malgré cela, de très nombreuses études n'ont conduit qu'à des données incomplètes quant aux mécanismes initiateurs de l'hépatocarcinogénèse (El-Serag *et al.*, 2007).

En effet, le caractère multifactoriel de ces mécanismes en rend la compréhension complexe et peu de gènes de prédisposition ont été décrits pour ces tumeurs. Cependant, l'existence d'agrégations familiales de cas de CHC lié à l'infection VHB, le potentiel carcinogène de l'AFB1 qui varie en fonction des polymorphismes individuels et l'existence de polymorphismes génétiques associés au développement de CHC chez les malades présentant une cirrhose d'origine alcoolique soulignent l'importance des interactions gènes-environnement dans les étapes précoces de la carcinogénèse hépatique (Cha *et al.*, 2005).

3-1- Origine virale :

a- Le virus de l'hépatite B (VHB) :

L'association entre les infections par le VHB et le CHC est suggérée par la forte incidence du CHC dans les zones d'endémie virale et par les études montrant que les sujets porteurs de l'antigène HBs (Ag-HBs) ou des anticorps HBc (Ac-HBc) avaient plus fréquemment un CHC que les patients sans marqueur viral. En cas d'hépatite chronique B, le CHC survient le plus souvent au stade de cirrhose chez les malades originaires d'Europe ou d'Amérique du Nord, mais peut survenir avant ce stade chez les malades africains ou asiatiques. Les sujets considérés comme porteurs inactifs de l'Ag-HBs et indemnes de cirrhose ont un risque très faible de développer un CHC (Sherman, 2005).

La coexistence de plusieurs causes de maladie chronique du foie augmente le risque de CHC. Il en est ainsi des co-infections VHB-VHC et VHB-VHD (virus de l'hépatite D) et la consommation alimentaire d'AFBI dans les zones où l'infection par le VHB est endémique. Schématiquement, on distingue deux mécanismes impliquant le VHB dans la carcinogenèse hépatique :

➤ Le premier mécanisme apparaît comme « indirect » et secondaire au processus de nécrose et de prolifération hépatocytaire suite à l'infection chronique.

➤ Le second mécanisme « direct » est associé au potentiel oncogénique du génome viral et comporte deux sous mécanismes : **la mutagenèse insertionnelle ou cis-activation** : l'insertion de l'ADN dans le génome humain peut conduire à des cassures ou des réarrangements chromosomiques. Deux cas de mutagenèse insertionnelle ont été décrits. Il s'agit de l'intégration du VHB dans le gène codant pour la cycline A, ou dans celui du récepteur bêta de l'acide rétinoïque modifiant ainsi leur expression. **La trans-activation** : elle consiste en l'activation anormale d'un gène cellulaire par une ou plusieurs protéines virales synthétisées à distance de ce gène par l'ADN du VHB intégré dans le génome de l'hôte. Il existe actuellement deux protéines pour lesquelles des propriétés trans-activatrices ont été bien démontrées in vitro: la protéine HBx, et la protéine d'enveloppe PréS2/S tronquée en C-terminale.

Il faut noter, que le rôle de l'expression de la protéine HBx, conditionnant la prolifération et la viabilité des cellules, associée ou non à l'intégration du VHB dans le génome cellulaire, joue un rôle majeur dans le processus de carcinogenèse hépatique (Fattovich et al., 2004 ; Cha et al., 2005).

b- Le virus de l'hépatite C (VHC) :

Divers arguments, principalement épidémiologiques, suggèrent que le VHC favorise le CHC par des mécanismes différents de ceux du virus B du fait de l'absence d'intégration dans le génome de l'hôte. En effet, des anticorps dirigés contre le VHC sont présents plus fréquemment chez les patients ayant un CHC (30 à 70 %) que dans la population générale (1 %). Ceci est en faveur de son implication dans la carcinogenèse hépatique. Deux mécanismes impliquent le VHC dans la survenue du CHC :

- **Indirect** : il est essentiellement lié à la cirrhose induite par le VHC, Cette dernière est le facteur de risque majeur pour le développement du CHC ;
- **Direct** : l'ARN viral et la réplication virale ont été mis en évidence dans des spécimens de CHC. Le rôle carcinogène direct de certaines protéines du VHC, telle la protéine de capsid, a été suspecté.

En cas de cirrhose virale C, le risque de survenue d'un CHC serait deux fois plus important en Asie qu'en occident, suggérant l'intervention de facteurs associés actuellement non identifiés. Dans ce même cas de figure, l'association d'une infection dite « occulte » par le VHB (en l'absence d'Ag-HBs dans le sérum) augmenterait le risque de CHC. Néanmoins, l'importance de ce phénomène nécessite des études complémentaires (**Fattovich et al., 2004 ; Cha et al., 2005**).

3-2- Origine toxique :**a- L'alcool :**

La cirrhose alcoolique s'accompagne d'un risque élevé de développement de cancer primitif du foie. Cependant, il n'est pas certain que l'alcool soit un carcinogène vrai ou qu'il agisse en tant que cofacteur en présence d'une infection Co-existante avec VHB et/ou VHC.

Plusieurs études épidémiologiques centrées sur des sujets alcooliques ont décrit une forte présence des marqueurs de VHB (16 à 70 %) et du VHC (10 à 20 %). Ces prévalences sont encore plus hautes chez les patients alcooliques ayant un cancer primitif du foie (27 à 81 % de marqueurs de VHB et 50 à 77 % de marqueurs de VHC), suggérant une interaction complexe entre l'alcool et les infections virales en termes d'étiologie du cancer primitif du foie.

En résumé, la consommation excessive d'alcool est une cause majeure de cirrhose et de CHC surtout en Amérique du Nord et en Europe. Le CHC survient presque exclusivement au stade de cirrhose. Le rôle carcinogène direct de l'alcool est fortement suspecté mais non démontré de façon indiscutable (**Kuper et al., 2000**).

b- Les carcinogènes chimiques :

Divers carcinogènes chimiques, dont l'AFB1, favorisent la survenue du CHC. Les aflatoxines sont des mycotoxines élaborées par *Aspergillus flavus*. Les zones à haute exposition à l'AFB1 (Afrique sub-saharienne et sud-est de l'Asie) étaient superposées à celles de haute endémie pour le VHB. Des études ont conclu que l'aflatoxine a un rôle dans la genèse du CHC seulement chez les patients ayant une hépatite chronique B préexistante. Une interaction semblable avec VHC chronique n'a pas été documentée. En effet, chez les sujets Ag-HBs positif, l'AFB1 peut provoquer l'apparition d'une mutation ponctuelle au niveau d'un gène suppresseur de tumeurs : gène de la protéine P53 (la fréquence de cette mutation serait de l'ordre de 50 à 67 %). D'autres carcinogènes chimiques telles les nitrosamines, le chlorure de vinyle ou les agents permettant la prolifération des peroxyosomes peuvent favoriser l'apparition de tumeurs primitives du foie (Faye, 2002 ; Cha et al., 2005).

c- Les autres causes de cirrhose :

Le risque de survenue du CHC est très variable en cas de cirrhose due à des affections hépatiques plus rares. En cas de cirrhose biliaire primitive, l'incidence du CHC serait du même ordre que celle observée en cas de cirrhose virale C. Cette incidence semble en revanche beaucoup plus faible en cas de cirrhose auto immune. D'autres maladies extrêmement rares telles que les maladies héréditaires de surcharge ont été retenues comme causes de CHC, il s'agirait de :

- **La tyrosinémie de type 1** : maladie à transmission autosomique récessive, qui même en cas de traitement préventif peut évoluer vers le CHC. Seule la transplantation hépatique peut réduire ce risque ;
- **Les glycoséoses** : peuvent être à l'origine de CHC, la transformation maligne se faisant vraisemblablement après la dégénérescence d'un adénome préexistant.
- **Le déficit en alpha-1-antitrypsine** : la prédisposition au cancer lié au déficit lui-même reste controversée. Comme il s'agit d'une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive, il a été observé chez les malades homozygotes un risque accru de CHC, alors que les hétérozygotes avaient le même risque que la population générale;
- **La maladie de Wilson** : dans les cas publiés, les patients étaient cirrhotiques et la majorité était de sexe masculin. Le CHC est survenu après une chélation efficace du cuivre. Il a été préconisé que le cuivre joue un rôle protecteur; la transformation maligne ne se produit que lorsque le taux de cuivre intra hépatique est redevenu normal.
- Enfin, dans le cas des Porphyries les tumeurs sont rares et surviennent aux environs de 60 ans (Fattovich et al., 2004 ; Cha et al., 2005).

4- Aspect physiopathologique

4-1- Physio-Pathologie :

Chez un patient atteint d'une maladie chronique du foie, un tissu cicatriciel remplace les cellules hépatiques endommagées : la fibrose hépatique. En cas de cirrhose, le tissu cicatriciel entoure des amas de cellules hépatiques qui régénèrent; ces amas constituent des nodules de régénération. Selon l'ampleur des dommages subis par le foie, la fibrose peut-être plus ou moins importante, et l'on distingue plusieurs stades, de la fibrose focale jusqu'à la cirrhose (**Fattovich et al., 2004**). La cirrhose est présente chez 80 à 90 % des patients avec un carcinome hépatocellulaire, et elle est considérée comme un état précancéreux. La cirrhose est définie par une fibrose mutilante, diffuse avec destruction de l'architecture du foie et formation de nodules parenchymateux (nodules de régénération) (**Schuppan et al., 2008**).

4-2- Pathologie tumorale :

Les cellules tumorales sont plus ou moins atypiques. Elles peuvent contenir des corps de Mallory, des globules hyalins, du glycogène, des graisses (cellules tumorales avec stéatose). Elles peuvent également produire de la bile. L'architecture de la prolifération tumorale, dans les tumeurs bien différenciées, reproduit plus ou moins celle du parenchyme hépatique avec des cellules organisées en travées par des sinusoides. Les travées de cellules tumorales sont plus épaisses que dans du foie normal et il existe une diminution du réseau réticulinique (**figure 6**).

L'architecture peut également être pseudo glandulaire (formation d'acini par dilatation du canalicule biliaire) ou compacte avec des massifs de cellules tumorales sans travée, ni sinusoides. On peut également observer des remaniements à type de péliose (dilatation des sinusoides), d'hémorragie ou de nécrose (**Trinchet et Ziol, 2012**).

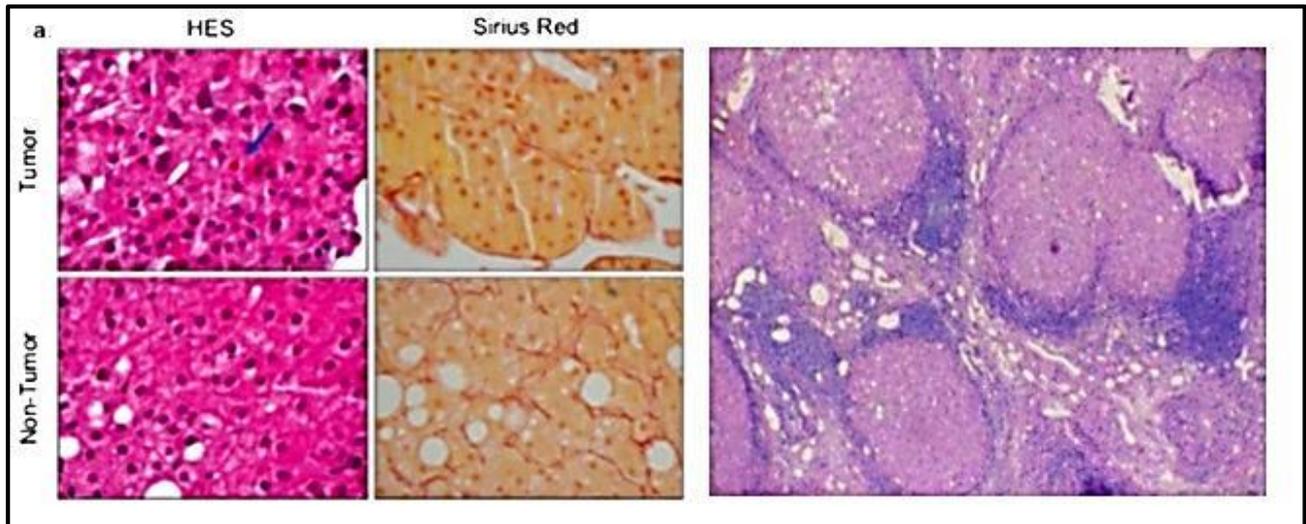


Figure 6 : Aspect cytologique du carcinome hépatocellulaire.

(a) Carcinome hépatocellulaire bien différencié. Le diagnostic repose sur des critères morphologiques, architecturaux et cytologiques. Par rapport aux hépatocytes non tumoraux (en bas), les rapports nucléo-cytoplasmiques sont augmentés et la densité cellulaire est élevée. À droite, sur la coloration par le rouge Sirius, le réseau sinusoïdal est nettement diminué (en haut) par rapport à celui du foie non tumoral (en bas). La flèche indique la production de bile par les cellules tumorales. (HES : coloration hématéine/éosine/safran).

(b) Cirrhose post hépatite chronique (d'après Trinchet et Ziol, 2012).

5- Mécanisme moléculaire de l'hépatocarcinogénèse :

L'atteinte la plus caractéristique dans l'hépatocarcinogénèse est une lésion hépatique chronique sous-jacente, ce qui conduit à des cycles répétés de mort des hépatocytes, inflammation et prolifération cellulaire compensatrice (la régénération des hépatocytes), qui fournit un environnement mutagène conduisant au développement du CHC. La carcinogénèse hépatique est un processus multi-étapes, les hépatites chroniques et la cirrhose étant les étapes pré-néoplasiques. En effet, dans la plupart des cas, durant surtout la phase de développement de la cirrhose, des phénomènes d'inflammation et de sénescence répliquative vont entraîner une accumulation d'altérations génétiques qui vont favoriser la sélection d'hépatocytes transformés (**figure 7**).

Ces altérations génétiques peuvent être divisées en deux groupes : le premier groupe comprend l'ensemble des modifications génétiques spécifiques liées aux différents facteurs de risque de la tumeur hépatocellulaire ; le deuxième groupe est constitué de l'ensemble des altérations génétiques non spécifiquement liées aux étiologies, y compris les gains et les pertes récurrentes de chromosomes, les modifications épigénétiques, les mutations d'oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans les CHC (**Laurent-Puig et al., 2006 ; Nakagawa et Maeda, 2012**).

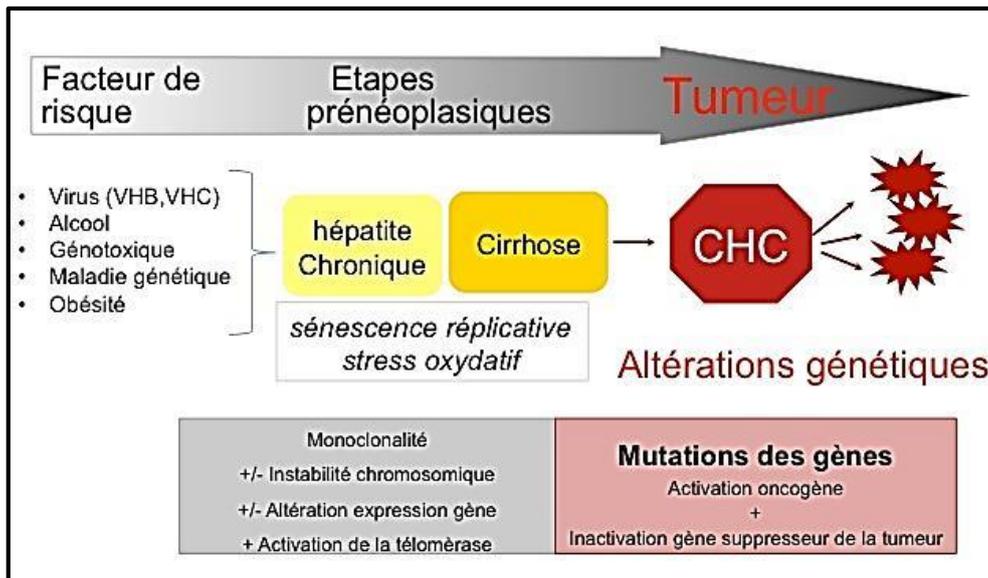


Figure 7 : Hépato-carcinogénèse : un processus multi-étapes (d’après Nakagawa et Maeda, 2012).

5-1- Mutations d’oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans les CHC :

Pendant ces 20 dernières années, différentes stratégies ont été utilisées pour identifier des mutations géniques somatiques dans les CHC, mais la plus fréquente était le séquençage de gènes candidats sur de larges séries de tumeurs. Récemment, le développement des technologies innovantes dans le domaine du séquençage de nouvelle génération (NGS), a permis le séquençage de l'ensemble des exons ou du génome entiers. Cette approche permet d'identifier rapidement et de manière exhaustive les événements génétiques clés, y compris des cibles thérapeutiques moléculaires potentiellement impliqués dans le CHC (figure 8) (Nault et al., 2014).

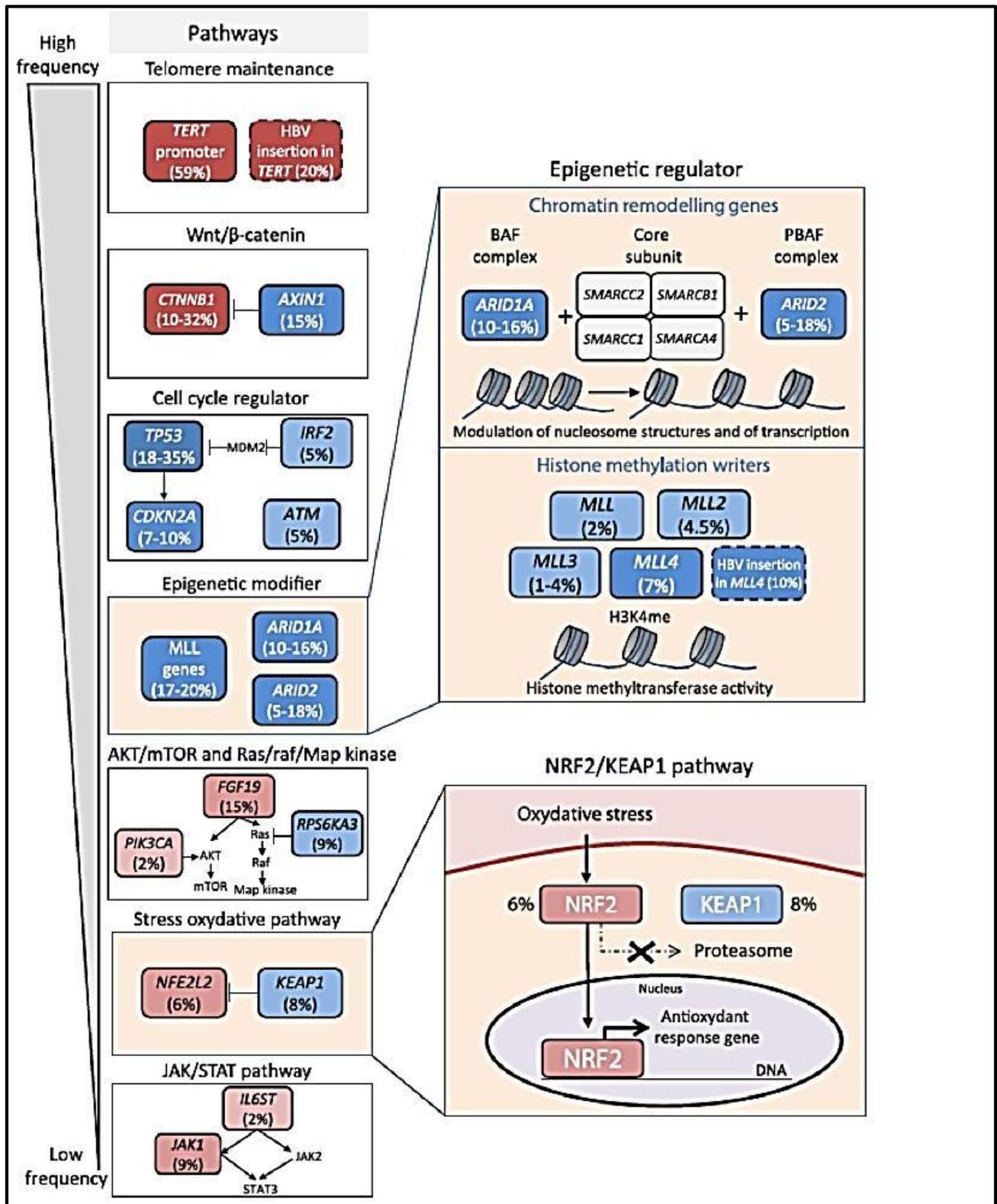


Figure 8 : Les voies de signalisation altérées dans l'hépatocarcinogénèse. Les voies mutées récurrentes dans le CHC sont présentées dans le panneau à droite. Les oncogènes sont indiqués en rouge et les gènes suppresseurs de tumeur sont en bleu, avec les pourcentages des mutations. (d'après Nault *et al.*, 2014).

a- La voie de la maintenance de télomère : des mutations somatiques dans le promoteur de TERT (Telomerase Reverse Transcriptase Gène) ont été décrites. Toutefois, ces mutations représentent l'altération génétique la plus fréquente dans le CHC (59 %) et la première altération génétique récurrente dans les lésions cirrhotiques pré-néoplasiques (25 %). Une forte association a été retrouvée entre les mutations du promoteur de TERT et les mutations activatrices de CTNNB1, ce qui suggère que les mutations du promoteur de TERT et l'activation de la voie Wnt/ β -caténine pourraient coopérer pour promouvoir la transformation maligne (Nault *et al.*, 2014).

b- La voie WNT/ β -caténine : c'est la principale voie oncogénique impliquée dans l'hépto-carcinogénèse. Elle joue un rôle clef dans la physiologie hépatique, en termes de différenciation, de renouvellement des cellules souches, de transition épithélio-mésenchymateuse, de zonation, de prolifération, d'adhésion cellulaire et de régénération du foie. Des mutations somatiques activatrices du gène CTNNB1 codant la β -caténine ont été identifiées dans 10 à 32 % des CHC, selon les étiologies. Ces mutations induisent l'accumulation de la β -caténine dans le noyau des hépatocytes. Les mutations somatiques classiques se trouvent dans l'exon 3 du gène CTNNB1. Les mutations dans les exons 7 et 8 du gène CTNNB1 ont été décrites récemment dans les CHC et les adénomes hépatocellulaires. Les mutations inactivatrices de l'AXIN1 présentes dans 8 à 15 % des CHC, peuvent aussi activer la voie WNT/ β -caténine, et sont mutuellement exclusives des mutations activatrices de CTNNB1 (Pez *et al.*, 2013).

c- La voie de régulateurs du cycle cellulaire/p53 : les gènes régulateurs du cycle cellulaire sont fréquemment altérés. Outre les altérations bien connues de TP53 et CDKN2A (codant deux suppresseurs de tumeur p14/ARF et p16/INK4a), les études de NGS ont identifié de nouvelles mutations récurrentes telles que les inactivations de IRF2 (5 %), et de ATM (5 %). IRF2 est un partenaire d'interaction de MDM2 (inhibiteur de p53), muté de manière exclusive à la mutation de TP53, et ses mutations conduisent à une inactivation fonctionnelle de TP53. ATM est une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN endommagé. Une fois activé, il entraîne un arrêt du cycle cellulaire et conduit soit à la réparation de l'ADN, soit à l'apoptose cellulaire (Fujimoto *et al.*, 2012).

d- La voie du remodelage chromatine des analyses de séquençage ont révélé des modifications fréquentes dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. En particulier, les mutations inactivatrices somatiques récurrentes d'ARID1A et d'ARID2 ont été identifiées dans environ 10 % des CHC. Les mutations récurrentes dans les gènes MLL (Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia, 2 %), MLL2 (4,5 %), MLL3 (1 %) et

MLL4 (7 %) ont également été identifiés. Ces gènes appartiennent à la famille « histone methylation writers » et codent la méthyltransférase H3K4 (histone H3 lysine 4) qui est impliquée dans la méthylation, l'acétylation et le remodelage des nucléosomes. De manière intéressante, des mutations d'insertion de séquence virale d'hépatite B dans les gènes MLL2 et MLL4 ont été décrit. Avec les mutations ARID1A et ARID2, ces données renforcent le lien entre les défauts du génome tumoral et les modifications épigénétiques dans la tumorigenèse hépatique (**Chen, et Zhang, 2013**).

e- La voie PI3K/Akt/mTOR et Ras/Raf/MAP kinase : des mutations activatrices de PIK3CA, FGF19 et des mutations inactivatrices de RPS6KA3 sont également des altérations génétiques récurrentes dans le CHC, conduisant à une activation constitutive de la voie PI3K/Akt/mTOR et Ras/Raf/MAP kinase (**Fujimoto et al., 2012**).

f- La voie du stress oxydatif : une autre voie de signalisation identifiée était celle de l'activation de la voie NRF2/KEAP1 qui intervient sous le stress oxydatifs. NRF2 (codée par NFE2L2) est un facteur de transcription qui est dégradé par le protéasome dans un complexe avec KEAP1 et CUL3. Lorsqu'il est activé, NRF2 se dissocie de KEAP1, migre vers le noyau et active la transcription de gènes antioxydants ; ces derniers donnent une survie avantageuse aux cellules tumorales (**Guichard et al., 2012**).

g- La voie JAK-STAT : l'activation de la voie JAK-STAT avec les mutations activatrices de JAK1 (9,1 %), ont également été décrites dans une série de CHC lié au VHB mais ces résultats ne sont pas retrouvés dans des tumeurs occidentales. Enfin, IL6ST est rarement muté dans les CHC en France (2 %), il est possible d'envisager un traitement de ces tumeurs présentant une activation de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib (**Guichard et al., 2012**).

5-2- Altérations chromosomiques :

Dans les CHC, les hépatocytes tumoraux accumulent un grand nombre de réarrangements chromosomiques conduisant à la formation de caryotypes très complexes.

L'ADN hyper-ploïde a été mis en évidence par la cytométrie en flux dans des cellules tumorales, ce qui suggère un gain global de matériel génétique dans la moitié des cas de CHC. L'hyper-ploïdie est également retrouvée dans 43 % des lésions dysplasiques observées dans les maladies cirrhotiques. Ces fréquences importantes suggèrent que les pertes de chromosomes suivies par l'endo-mitose sont des étapes précoces dans l'hépatocarcinogénèse pour le sous-groupe de tumeurs présentant une instabilité chromosomique (**Laurent-Puig et al., 2006**).

Au cours des 20 dernières années, de nombreux allélo-types centrés sur certains bras chromosomiques ou analysant l'ensemble du génome à l'aide de marqueurs microsatellites ont été publiés. Un consensus clair se dégage pour identifier les bras chromosomiques les plus fréquemment perdus, il s'agit, des chromosomes 17p, 8p, 16q, 16p, 4q, 9p, 13q, 1p, et 6q. Ces résultats sont en accord avec des expériences de CGH qui confirment la perte fréquente de ces segments de chromosomes et ont identifié des gains fréquents des chromosomes 1q, 7q, 8q et 17q. La mise en évidence de pertes alléliques récurrentes suggère l'existence de gènes suppresseurs de tumeurs localisés sur ces bras chromosomiques. En effet, la perte de l'une des deux copies de ces gènes constitue l'un des deux événements génétiques impliqués dans leur inactivation. L'identification des plus petites régions communes de délétion constitue un premier pas essentiel vers l'identification des gènes suppresseurs de tumeur (**Balsara et al., 2001**).

Jusqu'en 2012, les gènes suppresseurs de tumeur n'avaient pas encore été identifiés sur les chromosomes 1p, 4q, 8p et 16q. À l'opposé, pour les régions chromosomiques 6q, 9p, 13q, 16p et 17p, l'inactivation des gènes *IGF2R*, *P16*, *RBI*, *AXIN1* et *TP53* a été proposée comme cible des pertes chromosomiques. En général, les CHC peuvent être divisés en deux groupes en fonction de l'état de la stabilité chromosomique. Dans le premier groupe qui a une stabilité chromosomique, la mutation β -caténine avec une perte du chromosome 8p est souvent la seule altération génétique, qui est associée avec une tumeur de grande taille et un statut VHB/VHC négatif. Dans le second groupe, l'instabilité chromosomique est souvent associée avec des mutations dans les gènes *TP53* et *AXIN1*. Toutes ces modifications dans le second groupe, à l'exception des pertes sur 6q et 9p, sont associées avec l'infection par le VHB/VHC et avec une mauvaise différenciation des tumeurs. De plus, les pertes des chromosomes 9p et 6q sont retrouvées dans des tumeurs de mauvais pronostic (**Laurent-Puig et al., 2001**).

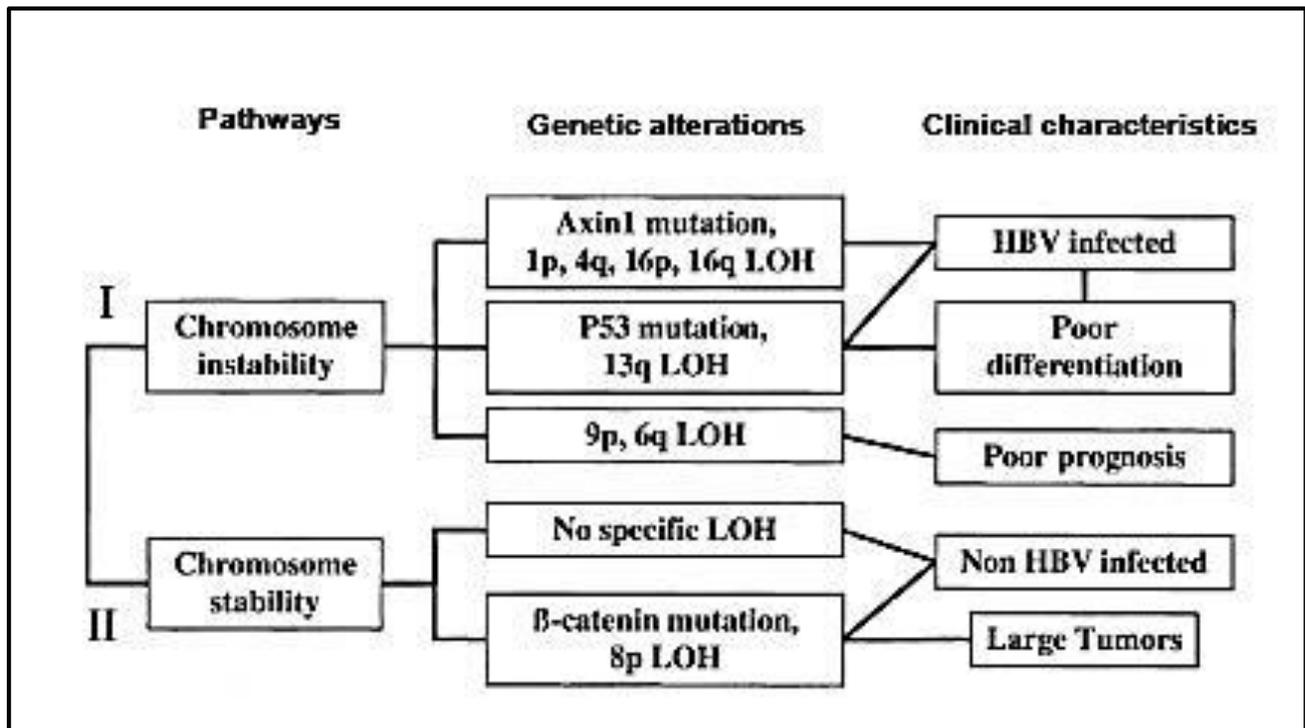


Figure 9 : Voies principales de l'hépatocarcinogénèse définies par des altérations génétiques et des paramètres cliniques. Les traits entre les carrés indiquent une corrélation significative (d'après Laurent-Puig *et al.*, 2001).

5-3- Modifications épigénétiques :

La chromatine est la forme sous laquelle l'information génétique de l'ADN est organisée dans une cellule. Cette organisation du génome influe considérablement les capacités d'activer ou d'éteindre des gènes. L'épigénétique, par définition, représente tous les changements héréditaires entre cellules influençant l'expression des gènes indépendamment des changements dans la séquence d'ADN elle-même. Ces mécanismes comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, le positionnement nucléosomique et les ARN non-codants, surtout l'expression des micro-ARNs, essentiels pour le maintien d'expression des gènes, le développement normal et la survenue d'états pathologiques comme le cancer chez les mammifères (Sharma *et al.*, 2010).

De nombreuses études récentes ont exploré le rôle des événements épigénétiques induits par des facteurs environnementaux dans le CHC et la cirrhose. Ces études ont permis d'identifier un grand nombre de gènes et de voies ciblées par la dérégulation épigénétique au cours du développement et de la progression du CHC. Les résultats sont conformes à l'idée que la dérégulation épigénétique associée à des facteurs de risque spécifiques dans les lésions précancéreuses précède et favorise le développement du CHC (Herceg et Paliwal, 2011).

6- Diagnostic du CHC :

6-1- Aspect clinique :

Le CHC est généralement asymptomatique, de découverte fortuite ou diagnostiqué lors d'un dépistage chez les patients cirrhotiques. Schématiquement, lorsqu'il est symptomatique, le CHC se traduit par quatre signes cliniques qui peuvent être isolés ou associés :

- **Altération de l'état général** : elle est d'autant plus fréquente et marquée, quand la tumeur est très évoluée. Elle se traduit par l'apparition d'une asthénie, anorexie, perte de poids ou une fièvre. Cette dernière peut être présente mais ne révèle qu'exceptionnellement la maladie.
- **Syndrome tumoral** : il évolue sur un mode aigu et/ou chronique.
 - **Mode aigu** : une crise douloureuse abdominale pouvant être le premier signe de révélation de la maladie et témoigne, soit de remaniements nécrotico-hémorragiques intra-tumoraux, d'un hématome sous capsulaire ou d'un hémopéritoine, soit de l'installation ou de l'aggravation d'une hypertension portale par thrombose de la veine porte.
 - **Mode chronique** : marqué par la présence d'une douleur de l'hypochondre droit irradiant typiquement vers l'épaule droite, une hépatomégalie irrégulière, volumineuse, nodulaire et sensible à l'examen.
- **Décompensation d'une cirrhose** : une greffe néoplasique sur un foie de cirrhose doit être envisagée devant une ascite réfractaire, exsudative ou hémorragique, une cholestase ou devant la survenue d'une hémorragie digestive.
- **Syndrome paranéoplasique** : son intérêt réside dans le fait qu'ils peuvent précéder l'expression clinique du CHC et de ce fait alerter à temps le clinicien. Il s'agit le plus souvent de modifications biologiques, sans signes cliniques correspondants, à type d'hypoglycémie, polyglobulie, hypercalcémie et hypercholestérolémie. Le syndrome paranéoplasique n'est ni spécifique de la néoplasie hépatique ni constant.
- **Formes cliniques** :
 - **Cirrhose maligne** : le foie est le plus souvent de grande taille mais il peut être atrophique, siège d'un carcinome miliaire hépatique aigu, qui est une véritable dégénérescence cancéreuse diffuse d'un foie qui était déjà implanté sur une cirrhose atrophique. Cliniquement, le syndrome d'hypertension portale est net, complet avec une circulation veineuse collatérale abdominale, des hémorragies digestives et une ascite abondante plus ou moins hémorragique. Le foie est pierreux et douloureux, l'état général est altéré; la décompensation de la cirrhose est inexplicable (sans présence de facteur déclenchant).

- **Formes pseudo-abcédées** : marquées par la présence d'un tableau clinique fait d'une fièvre à 39 à 40 avec des frissons, des hépatalgies vives et des douleurs en bretelle, avec une hépatomégalie à bords lisses.

En résumé, il faut retenir qu'à un stade symptomatique, le CHC est le plus souvent déjà arrivé à un stade très avancé, en dehors de toute ressource thérapeutique (**Deugnier et al., 1990**).

6-2- Aspect biologique :

Le profil protidique dans le cas du CHC sans cirrhose est comparable à celui retrouvés chez des sujets sains. En cas de cirrhose associée, il est identique à celui des sujets atteints de cirrhose non cancérisée. Paradoxalement, les tests de cytololyse sont inconstants, non ou peu perturbés même lorsque la nécrobiose est intense. L'augmentation des Phosphatases ALcalines (PAL) et des enzymes de cholestase, en dehors de tout ictère, apparaît comme un témoin du processus néoplasique.

L'alpha-fœtoprotéine (AFP) est le marqueur tumoral le plus important du CHC. Cependant l'augmentation de son taux au cours du CHC n'est pas spécifique. Sa sensibilité et sa spécificité sont en fonction de la valeur seuil fixée. L'AFP ne s'élève que dans 60 à 80 % des cas. Cette élévation ne devient significative que dans les tumeurs volumineuses et symptomatiques. Le taux de l'AFP est corrélé au degré de différenciation et à la taille de la tumeur. Les tumeurs bien différenciées sécrèteraient moins d'AFP que les tumeurs peu ou pas différenciées (**Huang et al., 2010 ; Peng et al., 2013**).

En résumé ; le diagnostic précoce de petits CHC chez les patients porteurs d'une hépatopathie chronique repose donc sur le dépistage systématique par l'imagerie, plus que sur le dosage de l'AFP.

7- Pronostic :

Le pronostic des patients classique est défini par des paramètres tumoraux (taille, nombre des tumeurs, invasion vasculaire), la fonction hépatique (la classification Child-Pugh) et l'état de santé générale (ECOG score). Concernant la complexité du CHC (qui est survenu souvent sur une maladie chronique du foie ou un fond cirrhotique), les critères cliniques ne sont pas toujours fiables. Avec les avancées dans le domaine moléculaire, une signature moléculaire robuste est dans certains cas nécessaire pour prédire avec précision le pronostic des patients. Récemment, un panel de 5 gènes (*TAF9*, *RAMP3*, *HNI*, *KRT19*, et *RAN*) ont été analysés et ont pu montrer une valeur pronostique assez pertinente (**Nault et al., 2013 ; 2014**).

8- Traitement :**8-1- Les traitements curatifs :**

La résection chirurgicale peut être effectuée sur un foie ayant conservé de bonnes fonctions hépatiques et porteur d'un CHC uni-focal pas trop volumineux (≤ 5 cm de diamètre), sans envahissement vasculaire ou dissémination métastatique. Lorsque ces conditions sont remplies, la survie post-résection est bonne : entre 50 et 100 % à 5 ans. Chez des patients ne remplissant pas ces conditions, d'autres prises en charges thérapeutiques peuvent être tentées, comme la transplantation hépatique ou les destructions partielles.

La transplantation hépatique est très efficace pour les CHC de petite taille, comme la résection chirurgicale, et peut profiter aux patients cirrhotiques. Les patients qui sont sélectionnés pour la transplantation ont un CHC constitué d'un nodule unique de diamètre $\leq 6,5$ cm, ou de 2 à 3 nodules de diamètre $\leq 4,5$ cm avec la somme de tous les nodules ≤ 8 cm. Cependant, ce traitement est lourd et coûteux, et la pénurie de greffons rend l'attente longue.

Les traitements locaux de CHC consistent en la destruction du tissu tumoral par injection d'une substance chimique nécrosante (de l'alcool absolu par exemple) ou par application d'un moyen physique comme l'hyperthermie par radiofréquences. Ils peuvent être réalisés par voie percutanée sous contrôle échographique ou à ventre ouvert après laparotomie. Les traitements locaux permettent de stériliser des nodules de CHC de petites tailles ($\leq 3-4$ cm de diamètre) mais n'ont aucun intérêt dans les formes métastatiques ou évoluées (**Huang et al., 2010 ; Peng et al., 2013**).

8-2- Les traitements palliatifs :

Il existe 3 principales modalités palliatives. L'embolisation artérielle hépatique a pour but d'ischémier et de nécroser le tissu tumoral, en utilisant généralement des particules de Spongel. La chimio-embolisation lipiodolée artérielle hépatique consiste en l'injection intra-artérielle d'un agent antimitotique (cisplatine ou doxorubicine) et d'un vecteur comme le Lipiodol. L'injection intra-artérielle hépatique de substances radioactives peut avoir un impact anti-tumoral. Ces trois principales modalités palliatives n'ont pas démontré de bénéfice au niveau de la survie des patients même si elles ont un effet anti-tumoral (**Salem et al., 2011**).

Partie Pratique

Techniques
de
diagnostic biologique
du VHC

La réalisation de la partie pratique du mémoire de Master a consisté en un stage de formation pratique pour une durée d'un mois au niveau de l'hôpital militaire Constantine. Lors de ce stage on s'est focalisé sur les techniques de diagnostic biologique d'une infection virale par VHC. L'approche utilisée dans cette structure d'accueil consiste en la détection des anticorps dirigés contre le VHC par la technique ELISA (d'après BIO-RAD Monolisa™ Anti-VHC PLUS Version 2).

I- Test utilisé pour le diagnostic biologique du VHC :

1- Principe du test :

La technique ELISA est une technique immuno-enzymatique de dépistage des anticorps Anti-VHC dans le sérum humain.

La trousse ELISA utilisée Monolisa™ Anti-VHC PLUS Version 2 (de la firme BIO-RAD) repose sur l'utilisation d'une phase solide préparée avec des antigènes purifiés : trois protéines recombinantes produites par *E.coli* à partir de clones sélectionnés dans la région non structurale (NS3 et NS4) et dans la région structurale du génome du VHC, et d'une phase liquide (conjuguée) constituée d'anticorps de chèvre anti-IgG humaines purifiés par chromatographie d'affinité et couplés à la peroxydase.

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

- Les échantillons à étudier ainsi que les sérums de contrôle sont distribués dans les cupules. Si des anticorps anti-VHC sont présents, ils se lient aux antigènes fixés sur la phase solide.
- Les anticorps anti-IgG humaines marqués à la peroxydase sont ajoutés après lavage. Ils se fixent à leur tour aux anticorps spécifiques retenus sur la phase solide.
- Après élimination du conjugué enzymatique non lié, le complexe antigène-anticorps est révélé par addition du substrat.
- Après l'arrêt de la réaction, la lecture s'effectue par spectrophotomètre à 450/620 nm. L'absorbance ou Densité Optique (DO) mesurée pour un échantillon permet de conclure quant à la présence ou l'absence d'anticorps anti-VHC. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-VHC liés sur la phase solide.

2- Composition de la trousse :

Tableau I : Composition de la trousse du test VHC-IgG ELISA (Monolisa™ BIO-RAD).

Etiquetage	Nature de réactifs	présentation	
		1 plaque	5 plaque
R1	MICROPLAQUE : 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec trois antigènes recombinants purifiés spécifiques de l'hépatite C	1	5
R2	SOLUTION DE LAVAGE CONCENTREE (20×) Tampon Tris NaCl pH 7,4 Conservateur : ProClin™ 300 (0.04%)	1 flacon 70 ml	1 flacon 235 ml
R3	SERUM CONTROL NEGATIF : Sérum humain négatif en Ag HB _S , en anti-HIV1 et en anti-HIV2 et en anticorps anti-HVC conservateur : Acide de sodium (<0.1%)	1 flacon 1ml	1 flacon 3ml
R4	SERUM CONTROL POSITIF : Sérum humain contenant des anticorps anti-VHC et négatif pour l'antigène HB _S et pour les anticorps anti-HIV1 et anti-HIV2, inactivé photochimiquement Conservateur : Acide de sodium (<0.1%)	1 flacon 1ml	1 flacon 3ml
R6	DILUANT POUR ECHANTILLON : Solution de lait écrémé : tampon PBS additionné du colorant témoin de dépôt échantillon Conservateur : Acide de sodium (<0.1%) et Thimerosal (0.01%)	1 flacon 15 ml	2 flacon 2 X 40 ml
R7	CONJUGUE : Anticorps de chèvre anti-IgG humaines marqués à la peroxydase Conservateur : Thimerosal (0.01%)	1 flacon 15 ml	2 flacon 2 X 40 ml
R8	TAMPON SUBSTRAT A LA PEROXYDASE : Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4,0 contenant 0.015% de H ₂ O ₂ et de 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO)	1 flacon 60 ml	2 flacon 2 X 60 ml
R9	CHROMOGENE : Solution contenant du thétraméthyl benzidine (TMB)	1 flacon 5 ml	2 flacon 2 X 5 ml
R10	SOLUTION D'ARRET : Solution d'acide sulfurique 1 N	1 flacon 28 ml	3 flacons 2 × 28 ml

* La trousse doit être gardée à +2 à 8°C.



Figure 10 : Composition de la trousse du test VHC-IgG ELISA (Monolisa™ BIO-RAD).

3- Matériel nécessaire :

- Agitateur type vortex.
- Appareil de lecture pour microplaques (équipés de filtres à 450/620-700 nm).
- Conteneur de déchets contaminés.
- Hypochlorite de sodium et bicarbonate de soude.
- Eau distillée ou désionisée.
- Éprouvettes graduées.
- Gants à usage unique et lunettes de protection.
- Papier absorbant.
- Pipettes, multi-pipettes, automatiques ou semi-automatiques, réglables ou fixes pouvant distribuer 10, 100 et 1000 μ l.
- Système de lavage, automatique, semi-automatique ou manuel pour microplaque.
- Tubes à usage unique.
- Bain-marie, ou incubateur sec thermostaté à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ou $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.



Figure 11 : Matériel nécessaire pour la réalisation du test VHC-IgG ELISA (Monolisa™ BIO-RAD).

4- Reconstitution des réactifs :

Avant l'utilisation des réactifs de la trousse Monolisa™ Anti-VHC PLUS Version 2, les laisser équilibrer à température ambiante pendant 30 minutes.

4-1- Réactifs prêts à l'emploi :

- **Réactif 1 (R1)** ou microplaque : chaque support cadre contenant 12 barrettes est conditionné en sachet. Une fois le cadre sorti, les barrettes non utilisées sont replacées immédiatement et remis à +2 à 8°C. Les barrettes ainsi conservées sont stables pendant 1 mois.
- **Réactif 6 (R6)** : diluant pour échantillons prêt à l'emploi (homogénéiser par retournement avant utilisation).
- **Réactif 7 (R7)** : conjugué prêt à l'emploi (homogénéiser par retournement avant utilisation).

4-2- Réactifs à reconstituer :

- **Réactif 2 (R2)** : solution de lavage concentrée R2 (20X). Diluer 20 fois la solution dans l'eau distillée. On obtient ainsi la solution de lavage prête à l'emploi. Prévoir 800 ml pour une plaque de 12 barrettes. Après dilution, cette solution se conserve 5 à 7 jours à +2 à 8°C.
- **Réactif 8 + 9 (R8 + R9)** : solution de révélation enzymatique (R8 + R9). Diluer le réactif R9 dans le réactif R8 au 1/10^{ème} (exemple : 1 ml de R9 dans 10 ml de R8) sachant que 10 ml sont nécessaires et suffisants pour traiter 12 barrettes. Après reconstitution, les réactifs conservés à l'obscurité sont utilisables pendant 6 heures à température ambiante (18 à 30°C).

5- Dépôt des échantillons à analyser :

Le test est effectué sur des échantillons non dilués de sérum ou de plasma (collectés avec des anticoagulants héparinés ou à l'EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)). Les échantillons présentant des agrégats doivent être clarifiés par centrifugation avant le test. Les particules ou agrégats de fibrine en suspension peuvent donner des résultats faussement positifs. Les échantillons seront conservés à +2 à 8°C si le dépistage est effectué dans les 7 jours ou peuvent être conservés en congélation à -20°C. Éviter les congélations/décongélations répétées.

Ne pas utiliser de sérums contaminés, hyper-lipémiques, ictériques, hémolysés ou inactivés à la chaleur. Avec ce test, aucune interférence n'a été mise en évidence sur des échantillons contenant jusqu'à 90 g/l d'albumine, et 200 mg/l de bilirubine, ainsi que sur des échantillons lipémiques contenant jusqu'à 36 g/l de triglycérides et sur des échantillons hémolysés contenant jusqu'à 1,25 g/l d'hémoglobine.

6- Mode opératoire :

- Suivre strictement le protocole proposé.
- Utiliser les sérums de contrôle négatif, seuil et positifs à chaque mise en œuvre du test pour valider la qualité du test.
- Établir soigneusement le plan de distribution et d'identification des échantillons.
- Préparer la solution de lavage diluée (R2).
- Sortir le cadre support et les barrettes (R1) de l'emballage protecteur.
- Déposer directement, sans pré-lavage de la plaque, successivement : 80 µl de diluant (R6) dans chaque cupule (après ajout du diluant violet, il est possible de vérifier par lecture(s) spectrophotométrique(s) à 620 nm la présence du diluant dans les cupules), 20 µl de sérum de contrôle négatif (R3) en A1, B1, 20 µl de sérum de contrôle positif (R4) en C1, D1, E1, 20 µl du premier échantillon en F1 si cette cupule n'est pas utilisée comme cupule témoin diluant pour la validation de dépôt des échantillons, 20 µl du deuxième échantillon en G1, etc... En fonction du système utilisé, il est possible de modifier la position ou l'ordre de distribution des contrôles.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A (R3)									
B (R3)									
C (R4)									
D (R4)									
E (R4)									
F									
G									
H									

- Homogénéiser le mélange par 3 aspirations minimum avec une pipette de 20 µl. Il est également possible de déposer 100 µl d'un échantillon préalablement dilué au 1/5^{ème}. Si la distribution des échantillons excède 10 mn, il est alors recommandé de distribuer les contrôles négatifs et positifs après les échantillons à tester. Après ajout de l'échantillon, le diluant vire du violet au bleu. Il est possible de vérifier par lecture spectrophotométrique à 620 nm la présence des échantillons dans les cupules.
- Couvrir d'un film autocollant en appuyant bien sur toute la surface pour assurer l'étanchéité.

- Incuber la microplaque au bain marie thermostaté ou dans un incubateur sec de microplaques pendant : procédure 1 : 60 ± 5 minutes à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ou procédure 2 : 60 ± 5 minutes à $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Retirer le film adhésif. Aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés (contenant de l'hypochlorite de sodium) et ajouter dans chacune d'elles un minimum de 0,370 ml de solution de lavage. Aspirer de nouveau. Répéter le lavage 2 fois (un minimum de 3 lavages). Le volume résiduel doit être inférieur à 10 μl (si nécessaire, sécher la plaque par retournement sur une feuille de papier absorbant). Si l'on dispose d'un laveur automatique, respecter le même cycle opératoire.
- Distribuer rapidement 100 μl de la solution de conjugué dans toutes les cupules. Le conjugué doit être agité avant emploi. Recouvrir d'un film neuf et incuber pendant : procédure 1 : 30 ± 5 minutes à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, procédure 2 : 30 ± 5 minutes à $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Le conjugué est d'une coloration verte. Il est possible de vérifier par lecture(s) spectrophotométrique(s) à 620 nm la présence du conjugué dans les cupules.
- Retirer le film adhésif, vider toutes les cupules par aspiration et laver 4 fois comme précédemment (si nécessaire sécher les barrettes par retournement sur une feuille de papier absorbant).
- Préparer la solution de révélation R8 + R9.
- Distribuer rapidement dans toutes les cupules 100 μl de la solution de révélation de l'activité enzymatique (R8 + R9) préalablement préparée.
- Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 ± 5 minutes à température ambiante (18 à 30°C). Lors de cette incubation, ne pas utiliser de film adhésif.
La distribution de la solution de révélation, qui est colorée en rose, peut être contrôlée visuellement à ce stade de manipulation. En effet, il y a une différence de coloration significative entre une cupule vide et une cupule contenant la solution de révélation rosée.
- Ajouter 100 μl de la solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation. Homogénéiser le mélange réactionnel par la suite. La distribution de la solution d'arrêt, qui est incolore, peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation. La coloration du substrat, rosée (pour les échantillons négatifs) ou bleu (pour les échantillons positifs), disparaît des cupules qui deviennent incolores (pour les échantillons négatifs) ou jaunes (pour les échantillons positifs) après addition de la solution d'arrêt.

- Essuyer soigneusement le dessous des plaques. Au moins 4 minutes après la distribution de la solution d'arrêt et dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction, lire la densité optique à 450/620 nm à l'aide d'un lecteur de plaques.
- S'assurer avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture, le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

7- Calcul et interprétation des résultats :

La présence ou l'absence des anticorps anti-VHC est déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil calculée. Calculer la moyenne des absorbances mesurées pour le sérum positif (DO R4).

Exemple : Contrôle positif R4

Échantillon	Densité optique
C1	1,636
D1	1,704
E1	1,650
Total	4,990

$$\text{Moyenne DO R4} = \frac{\text{Densité Optique Totale } 4,990}{3} = \frac{4,990}{3} = 1,663 \text{ 33}$$

Calcul de la Valeur Seuil (VS)

$$V_s = \frac{\text{Moyenne DO R4}}{5}$$

Exemple : Moyenne DO R4 = 1,663

$$VS = \frac{1,663}{5} = 0,332$$

Les critères de validation sont les suivants :

a- Pour le contrôle négatif : chaque valeur individuelle de l'absorbance mesurée doit être inférieure à 0,150.

b- Pour le contrôle positif : la moyenne des absorbances mesurées doit être supérieure ou égale à 1,000 et inférieure ou égale à 2,400. Si l'une des valeurs individuelles du contrôle positif s'écarte de plus de 30 % de la moyenne, refaire le calcul avec les deux valeurs de contrôle positif restantes. Le test est à recommencer si le contrôle négatif et/ou plus d'une valeur du contrôle positif sont hors de l'intervalle des valeurs ci-dessus.

Pour l'interprétation des résultats, les échantillons dont la densité optique est inférieure à la valeur seuil sont considérés négatifs d'après le test Monolisa™ Anti-VHC PLUS Version 2. Toutefois, les résultats de la valeur seuil (VS-10 % <DO<VS) doivent être interprétés avec prudence et il est

conseillé de tester de nouveau les échantillons correspondant en double lorsque les systèmes utilisés et les procédures du laboratoire le permettent.

Les échantillons dont la densité optique est supérieure ou égale au seuil sont considérés comme initialement positifs et doivent être testés encore en double avant l'interprétation finale. Après répétition de l'essai, l'échantillon est considéré positif d'après le test Monolisa™ Anti-VHC PLUS Version 2 si la deuxième et/ou la troisième mesure est (sont) positive(s), c'est-à-dire supérieure ou égale à la valeur seuil. L'échantillon est considéré négatif si ces deux valeurs sont trouvées inférieures à la valeur seuil.

8- Vérification spectrophotométrique du dépôt des échantillons et des réactifs (optionnel) :

8-1- Vérification du dépôt des échantillons : après ajout de l'échantillon, le diluant des échantillons (R6) vire du violet au bleu.

Méthode n°1 : n'utilisant pas de blanc réactionnel La présence des échantillons dans les cupules peut être vérifiée par lecture spectrophotométrique à 620 nm en comparant pour chaque cupule, les densités optiques mesurées après le dépôt du diluant des échantillons (R6) avec celles mesurées après la distribution des échantillons.

a) Lecture après dépôt du diluant : les valeurs de DO des cupules ne contenant que du diluant échantillon (R6) doivent être supérieures à 0,200.

b) Lecture après dépôt de l'échantillon / ou contrôle : une cupule contenant un échantillon à tester doit présenter une variation de DO supérieure à 0,200 (une variation de DO entre les deux mesures strictement inférieure à 0,200 indique une mauvaise distribution de l'échantillon à tester).
Variation DO = DO (Ech. + diluant) - DO diluant.

Méthode n°2 : nécessitant la réalisation d'un blanc réactionnel. La présence des échantillons peut être vérifiée par lecture spectrophotométrique à 620 nm en réalisant une seule lecture des DO obtenues pour chaque cupule après la distribution des échantillons et en les comparant avec la DO d'une cupule témoin ne contenant que le diluant des échantillons (R6) : la valeur de la DO de la cupule témoin ne contenant que du diluant échantillon (R6) doit être supérieure à 0,200. Une cupule contenant un échantillon à tester doit présenter une variation de DO supérieure à 0,200 en comparaison avec la cupule témoin.

8-2- Vérification du dépôt du conjugué : le conjugué (R7) est de coloration verte, sa présence dans les cupules peut être vérifiée par lecture spectrophotométrique à 620 nm : la valeur de DO mesurée pour chaque cupule devra être supérieure à 0,300 (une valeur se situant en dessous de cette norme indique une mauvaise distribution du conjugué).

8-3- Vérification du dépôt de la solution de révélation :

Il est possible de vérifier la présence de la solution de révélation rosée par lecture automatique à 490 nm : une cupule contenant la solution de révélation doit avoir une densité optique supérieure à 0.100 (une DO plus faible indique une mauvaise distribution de la solution de révélation). Il y a une différence de coloration significative entre une cupule vide et une cupule contenant la solution de révélation rosée.

II- Résultats :

La durée allouée à la réalisation du stage de formation en milieu hospitalier du mémoire de Master ainsi que le nombre limité de personnes orientés et/ou désireux de faire ce test ne nous a pas permis de procéder à une enquête épidémiologique prospective.

Dans ce cas de figure nous nous sommes orientés vers la possibilité d'une enquête épidémiologique rétrospective. Selon le registre de l'hôpital militaire Constantine, 40 cas (23 hommes et 17 femmes) de sérologie VHC (+) ont été recensés de Janvier 2015 à Mai 2016. Ce diagnostic a été établi avec le test illustré précédemment.

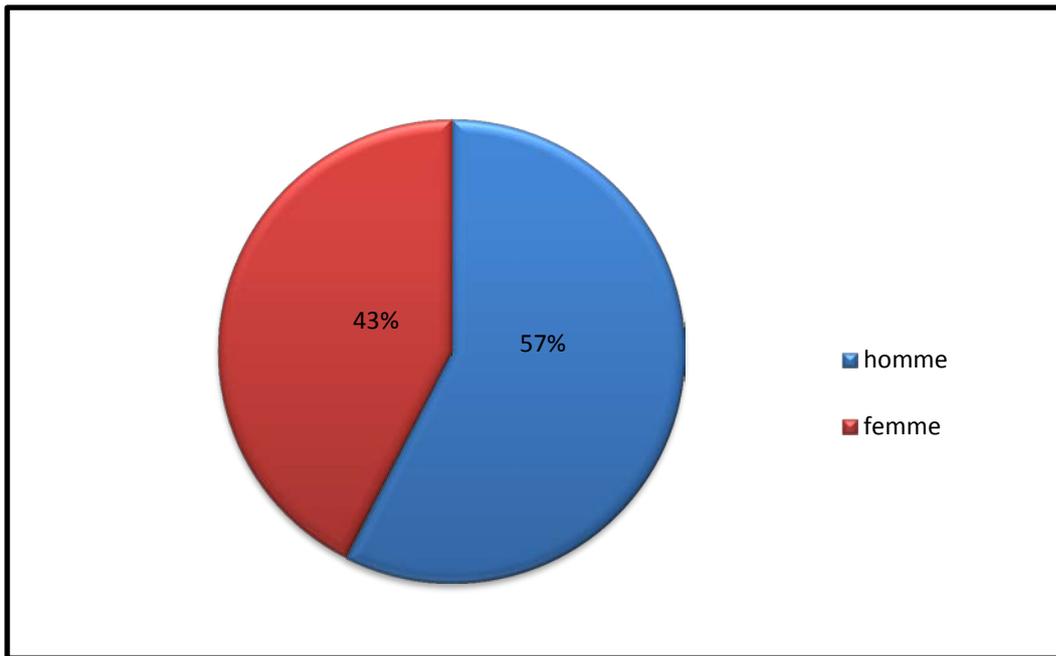


Figure 12 : Répartition selon le sexe des cas de VHC(+) enregistrés au niveau de l'hôpital militaire Constantine (Janvier 2015 à Mai 2016).

Discussion

Malgré le fait que notre pays est considéré comme une zone de moyenne endémicité, l'infection par le VHC en Algérie est une des principales causes d'hépatite chronique, de cirrhose du foie et de CHC et représente, en conséquence, un véritable problème de santé publique. Bien que des percés scientifiques majeures dans la compréhension de la biologie du VHC ont été réalisées ces dernières années, les options thérapeutiques restent à ce jour limitées et il n'y a pas de vaccin disponible. Le traitement actuel consiste en une bithérapie par interféron- α pégylé et ribavirine. Ce traitement difficilement toléré permet l'élimination du virus dans environ la moitié des cas.

L'amélioration de la prise en charge thérapeutique nécessite une meilleure connaissance du virus, de la physiopathologie de l'infection et des facteurs influençant la réponse au traitement. Ceci permettra d'améliorer le taux de succès thérapeutique. Une meilleure connaissance des facteurs influençant le traitement, des interactions virus-hôte, et du cycle répliatif du virus sont nécessaires afin de développer des thérapeutiques plus efficaces et mieux tolérées. Différentes molécules sont en cours de développement et permettront probablement d'augmenter le taux de succès thérapeutique des patients chroniquement infectés.

La mise en évidence d'une infection par le VHC est souvent effectuée chez des sujets ne présentant aucun symptôme d'atteinte hépatique. Ceci implique que l'utilisation des tests disponibles, sérologiques ou basés sur la caractérisation du matériel génétique, doit se faire en éliminant au maximum le risque de faux négatifs quand la recherche a pour but d'éviter tout risque de diffusion du virus et celui de faux positifs quand il s'agit de poser un diagnostic. Les tests sérologiques permettant la mise en évidence d'anticorps anti-VHC totaux se classent en tests de dépistage et tests de validation. De plus, des tests permettant la détection d'IgM anti-VHC ont été récemment développés. Les tests les plus couramment utilisés en première ligne sont de type immuno-enzymatiques (ELISA) sur microplaques ou sur billes de polystyrène. Les antigènes viraux utilisés sont des protéines virales recombinantes ou des peptides synthétiques qui diffèrent, suivant les tests, par leur longueur, leur structure et la localisation des régions du génome viral qui les codent. La plupart des tests utilisent des antigènes viraux permettant la détection d'anticorps dirigés contre des épitopes structuraux (antigènes de capsid) et des épitopes non structuraux (codés par les régions NS3, NS4 et NSS).

L'une des conséquences majeures de la diversité génétique du VHC est une réponse au traitement variable en fonction du génotype. La détermination du génotype est primordiale puisque les génotypes 1 et 4 sont plus résistants que les génotypes 2 ou 3 au traitement et que la durée de celui-ci est adaptée au génotype.

En plus de l'évolution silencieuse (asymptomatique) de la maladie et la fréquence élevée de passage à la chronicité (expliquant l'existence d'un « grand réservoir » de sujets infectés), la diversité génétique du VHC est l'un des principaux freins à la mise au point d'un vaccin. Dans ce contexte, il est important de connaître les différentes souches circulantes, et d'identifier leurs prévalences respectives. L'impact du génotype sur la réponse au traitement est mis en avant. Les paramètres pharmacologiques pourraient également être impliqués dans les réponses au traitement très éclectiques observées dans les populations où l'éradication virale est plus difficile.

La connaissance de la variabilité génétique des différents génotypes et sous-types est importante car elle permet aujourd'hui grâce à des analyses moléculaires de mieux comprendre l'origine et la diffusion de ce virus dans le monde. L'impact de cette variabilité sur la physiopathologie de l'infection et sur la réponse au traitement est mal connu et nécessite le développement d'outils capables de discriminer les génotypes et les sous-types pour pouvoir l'étudier.

Les tests de typage sérologique permettent de différencier les 6 génotypes mais ne permettent pas de discriminer les sous-types. C'est un test ELISA basé sur la détection d'anticorps dirigés contre la protéine NS4A et/ou core du VHC. Il est notamment utilisé pour déterminer le génotype de patients qui ne sont plus virémiques. Il convient de rappeler que le sérotypage est généralement moins sensible que le génotypage et qu'il ne permet pas actuellement de distinguer les sous-types viraux. En outre, il peut être faussement négatif chez les sujets immunodéprimés.

Malheureusement, dans notre pays, et dans l'abord de l'infection du VHC, la détermination du génotype et encore moins du sous-type n'est pas acquiescée en routine. Il sera intéressant d'introduire cette pratique qui permettra une meilleure prise en charge au niveau de nos structures de santé.

Un autre facteur viral important est la concentration d'ARN VHC plasmatique pré-thérapeutique. Une charge virale faible, inférieure à 800 000 UI/ml est prédictive d'une meilleure réponse au traitement. La cinétique de décroissance de la charge virale est également un facteur important et est utilisé dans la prise en charge des patients. Malheureusement, cette pratique n'est pas installée en Algérie auprès de nos cliniciens.

Le CHC est la résultante d'un processus complexe qui comporte plusieurs étapes et un temps de latence important entre l'infection primaire et l'apparition de la tumeur (20 à 50 ans). Le CHC survient généralement (mais pas toujours) sur une cirrhose préexistante, complication évolutive de l'hépatite chronique active. L'infection virale chronique pourrait jouer un rôle indirect en induisant une réponse immunitaire et une maladie nécro-inflammatoire, favorisant la libération de radicaux oxygénés, de cytokines et de facteurs de croissance. Dans ce contexte, la régénération hépatique serait accompagnée d'un risque accru de lésions de l'ADN et d'altérations génétiques. La survenue d'un certain nombre de CHC sur un foie non pathologique est un argument fort pour affirmer un rôle direct du VHC dans le processus tumoral. Cependant, le ou les mécanisme(s) exact(s) de survenue de cette carcinogenèse liée au VHC reste à déterminer.

Le développement de traitements préventifs (spécifiques ou non de l'étiologie) destinés à diminuer ou à retarder la survenue du CHC en interférant avec les mécanismes de la carcinogenèse hépatique est un thème de recherche très important. Chez les patients atteints de cirrhose, il existe actuellement beaucoup d'arguments suggérant qu'un traitement efficace de la cause de la maladie chronique du foie réduit le risque de survenue d'un CHC. En cas de cirrhose virale C, l'obtention d'une guérison virologique après traitement antiviral réduit très probablement le risque de CHC, même s'il n'est pas supprimé.

L'augmentation d'incidence du CHC en Algérie doit entraîner une prise de conscience de la communauté médicale, mais aussi des pouvoirs publics qui doivent mettre en œuvre les moyens nécessaires à la prévention et à l'évaluation du dépistage et du traitement de cette affection. La prévention de certaines causes de cirrhose est certainement l'approche la plus efficace. Concernant le VHC, les mesures de désinfection du matériel médical et le dépistage transfusionnel semblent efficaces. Chez les malades atteints d'hépatite chronique virale C, un traitement anti-viral efficace pourrait éviter l'évolution vers la cirrhose et réduire l'incidence du CHC. Même chez les malades atteints de cirrhose, plusieurs études ont suggéré qu'un traitement antiviral efficace pourrait diminuer l'incidence du CHC. Malheureusement cette pratique n'est pas adoptée en Algérie par la communauté médicale.

Le dépistage et le traitement précoce du CHC chez les malades atteints de cirrhose, déjà largement réalisés dans les centres d'hépatologie en Europe, doivent être mises en place en Algérie.

Le recours à des techniques de biologie moléculaire permettra de mieux définir le génotype et d'estimer efficacement la charge virale. Ces paramètres seront d'une importance certaine dans la prise en charge de l'infection par VHC et du même coup, indirectement, celle du CHC.

**Conclusion
et
Perspectives**

Plus de 600 000 personnes meurent chaque année d'un CHC. Il est urgent d'intensifier la recherche sur cette affection sur un plan mondial et local, aussi bien dans le domaine médical que pharmaceutique.

Aujourd'hui, le VHC est considéré comme un facteur de risque établi du CHC. Ce virus compte actuellement parmi les plus importants problèmes de santé publique. Les traitements contemporains étant inefficace chez un pourcentage élevé de la population, il existe donc un urgent besoin d'identifier de nouvelles cibles pour la génération d'antiviraux.

Concernant les mécanismes de carcinogenèse induite par le VHC, le niveau de connaissance est moins avancé que pour le VHB, car il est plus difficile d'identifier des mécanismes directement liés et spécifiques du virus lui-même. L'étude de la structure et de la physiologie du VHC est essentielle dans la démarche de mise en œuvre d'une thérapeutique. La détermination de la structure de son génome a défini des cibles thérapeutiques de choix et l'identification du génotype infectant conditionne la bonne réponse au traitement. Enfin, la connaissance des modes de transmission spécifiques au VHC permet d'affiner la stratégie thérapeutique pour certaines populations dites « à risque ».

Le traitement du CHC va dépendre du stade de la maladie au moment du diagnostic et les possibilités d'accès à des régimes thérapeutiques complexes. Cependant, à un stade avancé, la maladie est incurable et la prise en charge thérapeutique se révèle coûteuse et très peu efficace. Le développement de centres d'excellence en hépatologie pourrait contribuer à améliorer la prestation des services de santé dans le traitement du CHC. En concentrant ainsi la prise en charge, le niveau de compétence s'en trouverait amélioré et les résections hépatiques seraient pratiquées par des chirurgiens qui comprennent les maladies hépatiques et les limites de la résection et des autres interventions.

Sur un plan universel, la tâche la plus urgente est donc la prévention du CHC. La prévention de l'hépatite virale est la seule stratégie efficace et dans la plupart des pays. Une telle prévention a déjà été mise en place sous forme de vaccination des nouveau-nés contre l'hépatite B. Il est également nécessaire de prévenir les abus d'alcool ainsi que la propagation du VHC. Il est également très important de prévenir, par une gestion convenable des récoltes et du stockage des aliments, la formation d'aflatoxine. Une autre approche consiste également à sensibiliser la communauté médicale à la surveillance des patients à risque afin d'établir un diagnostic précoce et de pouvoir pratiquer l'ablation ou la résection de petites lésions hépatiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **ALTER H.** 2005. HCV natural history: the retrospective and prospective in perspective. *J Hepatol.* 43(4): 550-2.
2. **ASSELAH T, MARTINOT M, LEVY S et al.** 1999. HVR1 quasi-species in patients with chronic hepatitis C and normal ALT (abstract). *J Hepatol.* 30:121A.
3. **BALSARA BR, PEI J, DE RIENZO A et al.** 2001. Human hepatocellular carcinoma is characterized by a highly consistent pattern of genomic imbalances, including frequent loss of 16q23.1-24.1. *Genes Chromosomes Cancer.* 30(3), 245-253.
4. **BARTENSCHLAGER R, FRESE M et PIETSCHMANN T.** 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res.* 63:71-180.
5. **BENBEKHTI.** 2012. 6ème congrès maghrebo-français de médecine interne, 19èmes journées Nationales de médecine interne. Hépatites Virales chroniques B et C. 1-18p.
6. **BERAN RK, SEREBROV V AND et PYLE AM.** 2007. The serine protease domain of hepatitis C viral NS3 activates RNA helicase activity by promoting the binding of RNA substrate. *J Biol Chem.* 79: 15331-41.
7. **BOULANT S, MONTSERRET R, HOPE RG et al.** 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem.* 281:22236-47.
8. **BOYVAULT S, RICKMAN DS, DE REYNIES A et al.** 2007. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology.* 45(1), 42-52.
9. **BRUIX J et SHERMAN M.** 2005. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 42:1208-1236.
10. **BRUIX J, SHERMAN M, LIOVET JM et al.** 2001. Clinical management of hepatocellular carcinoma, conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference (European Association for the Study of the Liver). *J Hepato.* 35 : 421-30.
11. **BUKH J, MILLER RH et PURCELL RH.** 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. quasi-species and genotypes. 15:41-63.
12. **CABALLERIA L, PARES A, CASTEILS A et al.** 2001. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: similar incidence to that in hepatitis C virus-related cirrhosis. *J Gastroenterol.* 96 : 1160-3.
13. **CALLENS N, CICZORA Y, BARTOSCH B et al.** 2005. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol.* 79: 15331-41.
14. **CATANESE MT, ANSUINI H, GRAZIANI R et al.** 2010. Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *J Virol.* 84(1): p. 34-43.
15. **CHA C, DEMATTEO RP et SHERMAN M.** 2005. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 19: 25-37.
16. **CHEN JG et ZHANG SW.** 2013. Liver cancer epidemic in China: past, present and future. *Semin cancer biol.* 21(1), 59-69.

17. **CHENEY CP, CHOPRA S et GRAHAM C.** 2000. Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am.* 14:633-67.
18. **CHIANG DY, VILLANUEVA A, HOSHIDA Y et al.** 2008. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 68(16), 67796788.
19. **CHMIELEWSKA AM, RYCHŁOWSKA M, KRÓL E et al.** 2015. Novel methods of hepatitis C treatment and prevention. *Postepy Hig Med Dosw.* 19;69:946-63.
20. **CHOO QL, KUO G, WEINER AJ et al.** 1989. Isolation of a DNAC clone derivd from a blood-borne non-A, nonBviral hepatitis génome. *Science.* 224;395-362.
21. **COLIN C, LANOIR D et TOUZET S.** 2001. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat.* 8:87-95.
22. **DAVIDSON F, SIMMONDS P, FERGUSON J et al.** 1995. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5'non-coding region. *J Gen Virol.* 76:1197-204.
23. **DAVIS GL, ESTEBAN-MUR R, RUSTGI V et al.** 1998. Interferon a2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *Engl J Med.* 339:1493-9.
24. **DEUFFIC S, POYNARD T, BUFFAT L et al.** 1998. Trends in primary liver cancer. *Lancet.* 351 : 214-5.
25. **DEUGNIER Y, DUVAUFERRIER R, GUYADER D et al.** 1990. Carcinome hépatocellulaire : épidéniologie, physiopathologie, pathologie, expression et diagnostique. *Encycl Med Chir. foie-Pancréas.* 7038: 168.
26. **DIXIT V, QUAN S, MARTIN P et al.** 1995. Evaluation of a novel serotyping system for hepatitis C virus : strong correlation with standard genotyping methodologies. *J Clin Microbiol.* 33:2978-83.
27. **EINAV S, ELAZAR M, DANIELI T et al.** 2004. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Viral.* 78:11288- 95.
28. **EI-SERAG HB, DAVILA J, PETERSEN N et al.** 2003. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann lotem Med.* 139: 817-23.
29. **EI-SERAG HB, MASON AC, PETERSEN N et al.** 2000. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intem Med.* 160: 3227-30.
30. **EL-SERAG HB, RUDOLPH KL, PETERSEN N et al.** 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 132: 2257-2276.
31. **FATTOVICH G, STROFFOLINI T, ZAGNI L, et al.** 2004. Hepatocellular carcinoma in cinhosis : incidence and risk factors. *Gastroenterology.* 127: S35-50.
32. **FAYE GML.** 2002. Le carcinome hépatocellulaire au Sénégal. Mise aupoint sur les aspects diagnostiques et évolutifs :étude prospective dans le service de médecine interne du CHC Aristide Le Dentec. Thèse de médecine Sénégal. 03.
33. **FEINSTONE S, KAPIKIAN A, PURCELL R et al.** 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 292:767-70.
34. **FERGUSON, HAYASHI J, KANAMOTO-TAKANA Y et al.** 2000. Liver damage in hemodialysis patient s with hépatite C virus vermia: a prospective 10-yers Study. *Dig Dis Sci.* 45:2221- 2228.

35. **FERLAY J, BRAY F, PISANI P et al.** 2001. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Lyon: IARC Press. Pagination multiple.
36. **FUJIMOTO D, TOTOKI Y, ABE T et al.** 2012. Whole genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet.* 44(7), 760-764.
37. **GALE MJ, KORTH MJ, TANG NM et al.** 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology.* 230:217-27.
38. **GLOBOCAN.** 2008. International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan Cancer Fact Sheets. Liver Cancer. Pagination multiple.
39. **GLOBOCAN.** 2012. International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan Cancer Fact Sheets. Liver Cancer. Pagination multiple.
40. **GONZALEZ-PERALTA RP, LIU WZ, DAVIS GL et al.** 1997. Modulation of hepatitis C virus quasi-species heterogeneity by interferon-alpha and ribavirin therapy. *J Viral Hepatitis.* 4:99-106.
41. **GRIFFIN SD, HARVEY R, CLARKE DS et al.** 2004. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol.* 85:451-61.
42. **GUBLER JG.** 1990. Primary liver carcinoma in two sisters with acute intermittent porphyria. *J Med.* 89: 541.
43. **GUICHARD C, AMADDEO G, IMBEAUD S et al.** 2012. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 44(6), 694-698.
44. **HARRIS DR, GONIN R et ALTER HJ.** 2001. The relationship of acute transfusion-associated hepatitis of the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse. *Ann Intern Med.* 124-134.
45. **HERCEG Z et PALIWAL A.** 2011. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res.* 727(3), 55-61.
46. **HOOFNAGLE JH.** 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* 36:S21-9.
47. **HOSHIDA Y, NIJMAN SM, KOBAYASHI M et al.** 2009. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 69(18), 7385-7392
48. **HOUGHTON M , WEINER A, HAN J et al.** 1991. Molecular biology of hepatitis C viruse : implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology.* 14:381-8.
49. **HUANG J, YAN L, CHENG Z et al.** 2010. A randomized trial comparing radiofrequency ablation and surgical resection for HCC conforming to the Milan criteria. *Ann Surg.* 252:903-12.
50. **IKEDA K, ARASE Y, SAITOH S et al.** 2006. Prediction model of hepatocarcinogenesis for patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. Validation with internal and external cohorts. *J Hepatol.* 44:1089-97.
51. **INSTITUT NATIONAL DE PREVENTION et D'EDUCATION POUR LA SANTE (INPES).** 2007. Hépatite C : du dépistage au traitement, questions et réponses à l'usage des patients, St Denis. INES. 73 p.

52. **JAUFFRET-ROUSTIDE M, LE START Y, COUTURIER E et al.** 2007. National cross-sectional study among drug-users in France. *BMC Infection Diseases*. 9:113.
53. **JOPLING CL, YI M, LANCASTER AM et al.** 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 309: 1577-81
54. **KONNO T, MAEDA H, IWAI K et al.** 1983. Effect of arterial administration of high-molecular weight anticancer agent SMANCS with lipid lymphographic agent on hepatoma: a preliminary report. *J Cancer Clin Oncol*. 19, 1053-1065.
55. **KUPER H, TZONOU A, KAKLAMANI E et al.** 2000. Tobacco smoking, Alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 85: 498-502.
56. **LANDOULSI H.** 1992. Diagnostic et traitement du carcinome hépato-cellulaire. Thèse de Médecine. Pagination multiple.
57. **LASKUS TM, RADKOWSKI D, PETERSEN N et al.** 2000. Hépatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes /macrophage and lymphocyte . *J Infect Dis*. 181(2): 442-8.
58. **LAURENT-PUIG P, LEGOIX P, BLUTEAU O et al.** 2001. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 120(7), 1763-1773.
59. **LAURENT-PUIG P, ZUCMAN-ROSSI J, PETERSEN N et al.** 2006. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*. 25(27), 3778-3786.
60. **LEE JS, HEO J, LIBBRECHT L et al.** 2006. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*. 12(4), 410-416.
61. **LI K, FOY E, FERREON JC et al.** 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:2992-7.
62. **MARCELLIN P.** 2009. Hepatite C ; la guérison. *Gastroentérologie clinique et biologique*. 33 :819-829.
63. **MARTELL M, ESTEBAN JI, QUER J et al.** 1994. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasi-species in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *J Virol*. 3425-36.
64. **MARTINOT-PEIGNOUX M, ROUDOT-THORAVAL F, MENDEL I et al.** 1999. Hepatitis C virus genotypes in France : relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *J Viral Hepatitis*. 6:435-43.
65. **MCGLYNN K et LONDON W.** 2005. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 19:3-23.
66. **MCMULLAN LK, GRAKOU I, EVANS MJ et al.** 2007. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 2879-2884.
67. **MORADPOUR D, PENIN F et RICE CM.** 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 5:453-63.
68. **NAKAGAWA H et MAEDA S.** 2012. Molecular mechanisms of liver injury and hepatocarcinogenesis: focusing on the role of stress-activated MAPK. *Patholog Res Int*. 172894.
69. **NAULT JC, ZUCMAN-ROSSI J, VILLANUEVA A et al.** 2014. Genetics of hepatocellular carcinoma: the next generation. *J Hepatol*. 60(1), 224-226.

70. **NAULT JC, DE REYNIES A, VILLANUEVA A et al.** 2013. A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. *Gastroenterology*. 145(1), 176-187.
71. **ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ.** 2009. 72^{ème} assemblée mondiale de la santé. Hépatite virale. A63/22.
72. **PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J et al.** 2005. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 55: 74-108.
73. **PAWLOTSKY JM, LONJON I, HEZODE C et al.** 1998. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories ? *Hepatology*. 27:1700-1702
74. **PAWLOTSKY JM.** 2002. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. 36:S65-73.
75. **PENG ZW, ZHANG YJ, CHEN MS et al.** 2013. Radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. *J Clin Oncol*. 31:426-32.
76. **PERZ JF, ARMSTRONG GL, FARRINGTON LA et al.** 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 45:529-38.
77. **PEZ F, LOPEZ A, KIM M et al.** 2013. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol*. 59(5), 1107-1117.
78. **PILERI P, UEMATSU Y, CAMPAGNOLI S et al.** 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282:938-41.
79. **POLYAK S, FAULKNER G, CARITHERS R et al.** 1997. Assessment of hepatitis C virus quasi-species heterogeneity by gel shift analysis : correlation with response to interferon therapy. *J Infect Dis*. 175:1101-7.
80. **POYNARD T, MARCELLIN P et LEE SS.** 1998. Randomized trial of interferon alpha-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha-2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet*. 352; 1426-1432.
81. **POYNARD T, BEDOSSA P et OPOLON P.** 1997. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, META VIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 349:825-32.
82. **QUINTAVALLE M, SAMBUCINI S, DI PIETRO C et al.** 2006. The alpha isoform of protein kinase CKI is responsible for hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation. *J Viral*. 80: 11305-12.
83. **ROUILLE Y, HELLE F, DELGRANGE D et al.** 2006. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol*. 80:2832-41.
84. **SALEM R, LEWANDOWSKI RJ, KULIK L et al.** 2011. Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 140:497-507.
85. **SALEM R, LEWANDOWSKI RJ, MULCAHY MF et al.** 2010. Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology*. 138:52-64.

86. **SANGIOVANNI A, PRATI GM, FASANI P et al.** 2006. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients *Hepatology*. 43:1303-10.
87. **SAVEY A, SIMON F, LEPOUTRE A et al.** 2003. Investigation de 22 cas de contamination par le virus de l'hépatite C parmi des patients insuffisants rénaux chronique dans un centre d'hémodialyse. *BEH*. 85 : 16-17.
88. **SCHUPPAN D et AFDHAL NH.** 2008. Liver cirrhosis. *Lancet*. 371(9615), 838-851.
89. **SCHWER B, REN S, PIETSCHMANN T et al.** 2004. Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol*. 78:7958-68.
90. **SHARMA S, KELLY TK et JONES PA.** 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 31(1), 27-36.
91. **SHERMAN M.** 2005. Hepatocellular carcinoma : epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis*. 25 : 143-54.
92. **SHIBATA T, ISODA H, HIROKAWA Y et al.** 2009. Small hepatocellular carcinoma: is radiofrequency ablation combined with trans catheter arterial chemoembolization more effective than radiofrequency ablation alone for treatment? *Radiology*. 252:905-13.
93. **SIMMONDS P, MCOMISH F, YAP PL et al.** 1993. Sequence variability in the 5'non-coding region of hepatitis C virus : identification of a new a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol*. 74:661-8.
94. **SIMMONDS PA, ALBERTI HJ, ALTER F et al.** 1994. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. 19:1321-4.
95. **SIMMONDS PA, BUKH C, COMBET G et al.** 2005. Consensus proposes for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 42:962-73
96. **SOBESKY R, MATHURIN P, CHARLOTTE F et al.** 1999. Modeling the impact of interferon Alfa treatment on liver fibrosis in chronic hepatitis C; a dynamic view. *Gastroenterology*. 116:378-86.
97. **STOKKELAND K, BRANDT L, EKBOM A et al.** 2006. Improved prognosis for patients hospitalized with esophageal varices in Sweden 1969-2002. *Hepatology*. 43 : 500-5.
98. **SUZUKI T, AIZAKI H, MURAKAMI K et al.** 2007. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol*. 42:411-23.
99. **SZKLARUK J, SILVERMAN PM et CHAMSANGAVEJ C.** 2003. Imaging of the diagnosis, staging, treatment and surveillance of hepatocellular carcinoma. *AJR*. 180:441-454.
100. **TAYLOR DR, SHI ST, ROMANO PR et al.** 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*. 285:107-10.
101. **THIMME R, BINDER M et BARTENSCHLAGER R.** 2012. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol*. 36(3): 663-683.
102. **TRINCHET et ZIOL M.** 2012. Diagnostic des nodules sur cirrhose. *EMC*. 191-200.
103. **TROESCH M, MEUNIER I, LAPIERRE P et al.** 2006. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology*. 352(2):357-367.
104. **WALEWSKI JL, KELLER TR, STUMP DD et al.** 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*. 7:710-721.

105. **WALKER CM et GRAKOU I A.** 2015. Hepatitis C virus: why do we need a vaccine to prevent a curable persistent infection? *Curr Opin Immunol.* 35:137-43.
106. **WANG J, TONG W, ZHANG X et al.** 2006. Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells. *FEBS Lett.* 580:4392-400.
107. **WEINER AJ, BRAUER MJ, ROSENBLATT J et al.** 1991. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology.* 180:842-8.
108. **WEINER AJ, GEYSEN HM, CHRISTOPHERSON C et al.** 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants : a potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:3468-72.
109. **NGO Y, MAUGAT S, DUONG QT et al.** 2007. Risque d'hépatite C lié à des pratiques traditionnelles : une étude cas témoins à Ho-chi-ville. *épidémiologie et de santé Publique.* 55 ; 107-112.
110. **YI M et LEMON SM.** 2003. Non translated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol.* 77, 3557-3568.
111. **YOO CB et JONES PA.** 2006. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 5(1), 37-50.
112. **YU GY, LEE KJ, GAO L et al.** 2006. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol.* 80:6013-23.
113. **ZANETTI.** 2003. Primary Prévention of hépatitis C virus infection. *Vaccine.* 692-695.

Involvement of hepatic C virus in the development of hepatocellular carcinoma

Abstract:

The Hepatitis C virus (HCV) is an RNA virus, wrapped, which replicates in the liver and which is detectable in the serum during the acute and chronic stages of infection. It is a global health problem that affects over 200 million people worldwide. After contact with the virus, 75 to 85% of people develop chronic infection that long sometimes leads to cirrhosis and increases the likelihood of developing liver cancer. To date, the only treatment to cure the infection in 50-75% of cases, depending on genotype and viral load during infection, is the administration of IFN- α in combination with ribavirin. However, this expensive treatment causes many side effects. In addition, there is no vaccine against HCV.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant tumors of the liver and occurs most often in a patient with cirrhosis. Liver carcinogenesis is usually the result of a multistep process beginning with exposure to different risk factors, followed by the development of chronic liver disease and cirrhosis that is a pre-neoplastic lesion; and finally, after the development of HCC.

Cirrhosis is the main risk factor for onset of HCC. The fight against exposure to major etiological factors of chronic liver disease (chronic alcoholism, infections with HCV and HBV, including anti-HBV vaccination) is therefore a very effective preventive measure and is the best way to limit the spread of this malignancy mostly in developing countries.

Diagnosis Laboratory diagnosis of HCV in Algeria is based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that quickly shown their limits. Indeed, these serological techniques do not allow to determine the genotype and to estimate the viral load. The implementation of a molecular biology platform whose job it could greatly improve the treatment of this infection in our country and allow early diagnosis of HCC.

Key words: Hepatic C virus, Hepatocellular carcinoma, ELISA.

تورط فيروس التهاب الكبد س في ظهور سرطان الكبد

فيروس التهاب الكبد الوبائي (سي) هو فيروس RN ملفوفة، يتكرر في الكبد و يمكن كشفه في مصل الدم خلال المراحل الحادة والمزمنة من العدوى. وهي مشكلة صحية عالمية تآثر على أكثر من 200 مليون شخص في جميع أنحاء العالم.

بعد الاتصال مع الفيروس، فإن 75 إلى 85% من الناس قادرين على تطوير عدوى مزمنة لفترة طويلة في بعض الأحيان تؤدي إلى تليف الكبد وتزيد من احتمال الإصابة بسرطان الكبد.

حتى الآن، فإن العلاج الوحيد لهذه العدوى في 50-75% من الحالات، يعتمد على التركيب الوراثي والحمل الفيروسي خلال العدوى، وبمساعدة IFN- α المركب مع ريبافيرين.

ومع ذلك فإن هذه العلاجات باهظة الثمن وتترك العديد من الآثار الجانبية. وبالإضافة إلى ذلك، لا يوجد لقاحات مناهضة للفيروس HCV.

سرطان الكبد (HCC) هو من الأورام الخبيثة الأولية الأكثر شيوعاً في الكبد وغالباً ما يحدث لدى مريض يعاني من تليف الكبد. حيث الكبد المتسربن عادة ما يكون نتيجة لعملية متعددة الخطوات بدءاً من التعرض لمختلف العوامل الخطيرة، تلاه تطور مرض الكبد المزمن وتليف الكبد وهذا هو آفة ما قبل الأورام. تليف الكبد هو عامل الخطر الرئيسي لظهور سرطان الكبد.

المسببات الرئيسية لمرض الكبد المزمن هي (الإدمان على الكحول المزمن، عدوى التهاب الكبد الوبائي والتهاب الكبد الوبائي، بما في ذلك التطعيم HBV) هي تدبير وقائي جداً على نحو فعال وهو أفضل وسيلة للحد من انتشار هذا الورم الخبيث في معظم البلدان النامية.

ويستند التشخيص المخبري لفيروس (سي) في الجزائر على انزيم الارتباط المناعي ELISA وهذا يظهر بسرعة حدوثها. في الواقع، أطروحة هذه التقنية المصلية لا تسمح بتحديد النمط الجيني وتقدير الحمل الفيروسي. لهذا وجب علينا تنفيذ برنامج البيولوجيا الجزيئية الذي يمكننا من أن نرى تحسن كبير في علاج هذا المرض في بلادنا والسماح بالتشخيص المبكر لسرطان الكبد.

الكلمات المفتاحية: فيروس التهاب الكبد س; سرطان الكبد; ELISA.

Implication du virus de l'hépatite C dans le développement du carcinome hépatocellulaire

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

Le Virus de l'hépatite C (VHC) est un virus à ARN, enveloppé, qui se réplique dans le foie et qui est détectable dans le sérum durant les phases aiguë et chronique de l'infection. C'est un problème de santé mondial qui affecte plus de 200 millions d'individus de par le monde. Après contact avec le virus, 75 à 85 % des personnes développent une infection chronique qui à long terme conduit parfois à la cirrhose et augmente les probabilités de développer un cancer hépatique. À ce jour, le seul traitement permettant de guérir l'infection dans 50 à 75 % des cas, selon le génotype et la charge virale lors de l'infection, est l'administration d'IFN- α en combinaison avec la ribavirine. Cependant, ce traitement coûteux engendre de nombreux effets secondaires. De plus, il n'existe pas de vaccin contre le VHC.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la plus fréquente des tumeurs malignes primitives du foie et survient, le plus souvent, chez un patient atteint de cirrhose. La carcinogenèse hépatique est en général le résultat d'un processus multi-étapes débutant avec l'exposition à différents facteurs de risque, suivie du développement d'une hépatopathie chronique et d'une cirrhose, véritable lésion pré-néoplasique ; et pour finir, après, le développement d'un CHC.

La cirrhose est le facteur de risque principal de survenue du CHC. La lutte contre l'exposition aux principaux facteurs étiologiques des maladies chroniques du foie (alcoolisme chronique, contaminations par le VHC et le VHB, notamment vaccination anti-VHB) est donc une mesure préventive très efficace et reste le meilleur moyen de limiter la propagation de cette pathologie cancéreuse essentiellement dans les pays en voie de développement.

Le diagnostic biologique du VHC en Algérie est basé sur des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) qui ont rapidement montrés leurs limites. En effet, ces techniques sérologiques ne permettent pas de déterminer le génotype ainsi que d'estimer la charge virale. La mise en place d'une plateforme de biologie moléculaire dévolue à cette tâche pourrait grandement améliorer la prise en charge de cette infection dans notre pays et permettre un diagnostic précoce du CHC.

Mots clefs : Virus de l'hépatite C, Carcinome hépatocellulaire, ELISA.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Microbiologie, hôpital militaire Constantine.

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UFM Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *SATTA Dalila* (PROF - UFM Constantine).

Rapporteur : *REZGOUNE Mohamed Larbi* (MA.A - UFM Constantine).

Examineur : *FERTOUL-GHARZOULI Razika* (MC.B - UFM Constantine).

Date de soutenance : 19/06/2016