

Sommaire

Remerciements	2
La liste des abréviations	4
La Liste des figures	5
Résumé	6
Généralité sur l'IPM	7
2) Organigramme d'IPM	8
Introduction	9
CHAPITRE1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	10
1) Découverte de l'hépatite B	11
2) Taxonomie	11
3) Structure	11
3-1) Morphologie	11
3-2) Organisation du génome	13
4) Cycle de réPLICATION du virus de l'hépatite B	13
5) Epidémiologie	14
5-1) La prévalence de l'hépatite B à l'échelle mondiale	14
5-2) La prévalence du génotype de l'Hépatite B	15
5-3) La prévalence de l'hépatite B au Maroc	16
6-Mode de transmission :	17
7-Symptômes	17
8-Traitements	18
9-Prévention	18
10-Vaccin	18
Chapitre II : I-Matériel et méthodes	19
A) Déduire la charge Virale à partir du sang du patient	19
1) Prélèvements, transport et conservation des échantillons :	19
2) Extraction automatisée par le COBAS AmpliPrep :	19
3) Amplification et détection de l'ADN viral par PCR en temps réel	19
3.1. Principe de la méthode :	20
3.2. Amplification de la cible :	20
3.3. Détection des produits PCR dans un test COBAS TaqMan 48 :	20
Chapitre III : résultats et discussion	22
1- Répartition globale selon le sexe et log	22
2-Répartition par âge et par sexe	23
3-Répartition par moyenne de log selon le sexe et l'âge	24
Références	25
Annexe1	29
Annexe 2	30
Annexe 3	33

Liste des Abréviations :

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
Ag HBC	:	Antigène de capsid de l'hépatite B
Ag HBe	:	Antigène e de l'hépatite B
Ag HBs	:	Antigène de surface de l'hépatite B
ELISA	:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
PCR	:	Polymerase chain reaction
SQ	:	Standard de quantification
VHB	:	Virus de l'hépatite B
VIH	:	Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des figures

Figure 1 : Les trois forme du HBV vu en microscope électronique	9
Figure2 : virus de l'hépatite B	10
Figure3 : Virus de l'hépatite B (particule de Dane)	11
Figure 4 : Cycle de réPLICATION du HBV	12
Figure 5: Répartition géographique de la prévalence de l'hépatite B	13
Figure 6: La Répartition géographique des génotypes du virus de l'hépatite B dans le monde	14
Figure 7: résultat d'un patient à une charge Virale positive	19
Figue8 : Répartition de l'infection selon le sexe	22
Figure 9 : Répartition de l'infection selon le log	22
Figure 10 : La répartition de l'infection selon le sexe et l'âge	23
Figure 11 : répartition de la charge virale (log) selon les tranches d'âge et le sexe.	25
Figure 12 : Figure 12 : Répartition de l'infection selon les tranches d'âge et la moyenne du log(2013)	35

Résumé

L'hépatite Virale B est une maladie infectieuse strictement humaine. C'est une infection du foie potentiellement mortelle, fréquente et silencieuse qui peut toucher tout le monde. 360 millions de personnes souffrent d'infection chronique, plus d'un million d'entre eux décèdent chaque année suite à des complications liées à cette infection, en particulier la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire.

Le HBV est très contagieux puisqu'il a la capacité de garder son pouvoir infectieux pendant plus de 7 jours à température ambiante. Il n'existe pas de traitement spécifique, Le diagnostic de l'hépatite Virale B dans la biologie moléculaire se base sur la détermination de la charge virale (multiplication du virus) pour évaluer l'efficacité thérapeutique. Le vaccin reste la meilleure solution pour se protéger contre le virus.

Pour conclure, le VHB représente la 10eme cause de mortalité dans le monde et une des trois premières causes de décès en Asie et en Afrique.



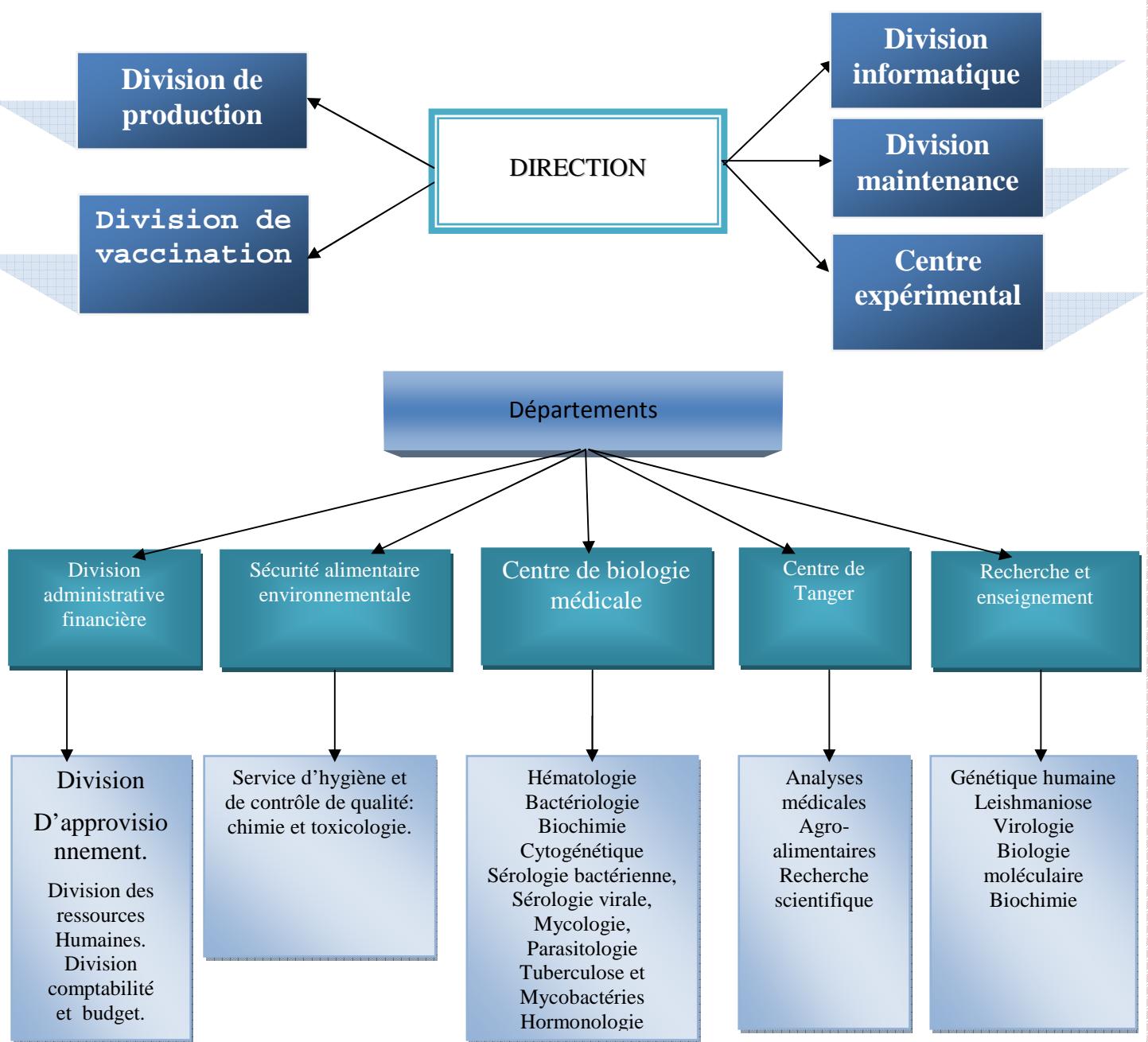
Loui pasteur (1822-1895)

1- Généralités sur l'institut Pasteur :

L'IPM est un établissement public, doté de la personnalité civile et de l'autonomie financière, placé sous la tutelle administrative du ministre chargé de la santé publique et dont le siège est à Casablanca.

La présence Pasteurienne au Maroc remonte à 1911, date à laquelle une filiale de L'institut Pasteur de Paris avait été créée à Tanger. Rapidement après la signature de la convention de Fès en 1912, L'institut Pasteur de Tanger s'est trouvé séparé du Royaume du Maroc sous protectorat français et en décembre 1928 le Dr Edmond Sergent fut chargé d'étudier la création d'un nouvel Institut Pasteur. Le 15 novembre 1929 fut décidé la création de L'institut Pasteur du Maroc à Casablanca, sur l'initiative du Dr Emile Roux, à l'époque directeur de L'institut Pasteur à Paris et de Mr. Lucien Saint, Résident Général de La république Française au Maroc. Et ce n'est qu'en 1967 que les deux Instituts Pasteur, celui de Tanger et celui de Casablanca, furent réunis pour constituer L'institut Pasteur du Maroc par Décret (N-176-66 du 14 Raia I 1387/23 Juin 1967).

2) Organigramme d'IPM :



I-Introduction :

Les maladies virales connaissent un véritable essor depuis une vingtaine d'années. L'apparition de nouveaux virus (VHI, VHC, etc....) dont la diffusion est susceptible de provoquer de redoutables épidémies a été établie.

Le terme hépatite virale est utilisé pour toutes maladies inflammatoires diffuses du foie sous la dépendance d'une infection par un virus.

Elles sont actuellement au nombre de cinq (désignés alphabétiquement de A à E) différentes par leur mode de transmission (féco-orale pour les virus A et E ; parentérale pour les virus B et C) et leur agressivité ^(1,2). Plus récemment, un virus dit de l'hépatite G a été caractérisé sans que son implication dans des pathologies hépatiques soit établie. ^(3, 4,5).

Parmi ces hépatites virales, l'hépatite B arrive au deuxième rang des agents cancérogènes connus pour l'homme, après le tabac. ^(OMS).

L'hépatite virale B est une infection du foie potentiellement mortelle. C'est une maladie fréquente et silencieuse qui peut toucher tout le monde. C'est une maladie évolutive qui peut passer d'une forme aiguë à une forme chronique. Elle touche environ 10% des adultes ⁽⁶⁾, 30 à 50% des enfants infectés entre 1an et 4ans et 90% des bébés infectés par l'hépatite B avant l'âge de 1an ne parviennent pas à éliminer le virus et développent une infection chronique ⁽⁷⁾.

- L'hépatite aiguë B : Cette forme de la maladie est peu fréquente, elle peut durer de quelques semaines à quelques mois (moins de 6 mois). La plupart des personnes souffrant de la forme aiguë du virus guérissent complètement.
- L'hépatite chronique B (quand le virus persiste au-delà de 6 mois) est la plus grave. Une personne atteinte d'hépatite chronique B peut l'être à vie. 25% des personnes souffrant de cette forme de la maladie finiront par mourir d'une maladie du foie. ⁽⁸⁾

Dans de très rares cas, l'hépatite aiguë prend une forme fulminante mortelle en l'absence de greffe de foie rapide ⁽⁹⁾.

Malgré l'existence d'un vaccin efficace, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique mondiale, L'organisation mondiale de la santé

(OMS) estime que plus de 2 milliards de personnes ont été infectées par le virus de l'hépatite B au cours de leur vie, soit environ 30 % de la population mondiale ⁽¹⁰⁾. Parmi cette population, 360 millions (soit 5%) souffrent d'infection chronique, essentiellement sur les continents asiatique et africain. Plus d'un million d'entre eux décèdent chaque année des complications liées à cette infection, en particulier la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire ^(11,12)

Le virus de l'hépatite B (VHB) est 50 à 100 fois plus contaminant que le VIH ^(OMS).

L'OMS organise également le 28 juillet de chaque année la Journée mondiale contre l'hépatite pour sensibiliser l'opinion publique et mieux faire comprendre la maladie.

Notre travail consiste à étudier le virus de l'hépatite B au Maroc : sa prévalence parmi la population marocaine, son mode de transmission ... mais surtout le diagnostic au sein du laboratoire de la biologie moléculaire.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1) Découverte de l'hépatite B :

Le virus de l'hépatite B a été découvert en 1963, quand B.S. Blumberg a mis en évidence une réaction inhabituelle entre le sérum d'individus polytransfusés et celui d'un aborigène australien. Il a alors désigné l'antigène découvert sous le nom d'antigène « Australia »⁽¹³⁾. En 1967 le nom d'antigène HBs, c'est-à-dire antigène de surface de l'hépatite B, fut imposé pour désigner cet antigène⁽¹⁴⁾ dont la découverte a valu à B.S. Blumberg le prix Nobel en médecine en 1976.

En 1970, D.S. Dane identifiait en microscopie électronique, dans le sérum des malades porteurs de l'antigène Au, des particules «en cocarde» de 42 nm de diamètre (la particule de Dane), qui devaient ultérieurement être considérées comme les particules virales infectieuses du HBV⁽¹⁵⁾.

2) Taxonomie : ⁽¹⁶⁾

Le virus de l'hépatite B (VHB) fait partie de la famille des Hepadnaviridae, virus à ADN hépatotropes. Cette famille regroupe deux genres qui ont des caractéristiques communes comme la morphologie, l'organisation génétique, le mode de réPLICATION, et la spécificité d'hôte.

- Le genre Avihepadnavirus regroupe les virus du canard de Pekin, du héron, de la cigogne et de l'oie des neiges. Ils diffèrent des virus des mammifères par l'absence du gène X
- Le genre Orthohepadnavirus comprend le virus de l'hépatite B humain ainsi que les virus des rongeurs : le virus de la marmotte, les virus des écureuils et les virus des singes ne sont pas classés dans des espèces séparées.^(16,17)

3) Structure :

3-1) Morphologie :

Trois formes différentes du virus de l'hépatite B ont été identifiées par microscopie électronique dans le sérum des patients infectés : des particules infectieuses appelées particules de Dane de 42 nanomètre, et des particules non-infectieuses, sphériques ou allongées correspondant à une production excessive des protéines d'enveloppe.

Les sphères, de 22 nm de diamètre, et les bâtonnets de même diamètre mais longs de plusieurs centaines de nanomètres, sont composées de protéines d'enveloppe virales et de lipides cellulaires. Ces particules ne sont pas infectieuses puisqu'elles sont dépourvues d'ADN. Elles

sont 10 000 à 1 000 000 fois plus nombreuses que les particules de Dane dans le sérum des sujets infectés.

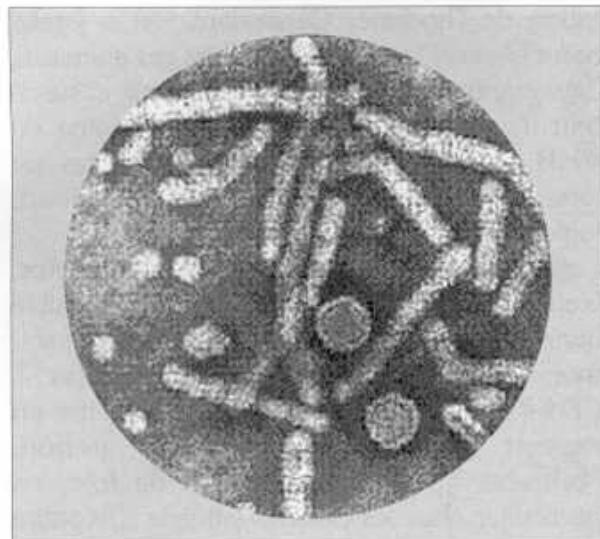


Figure 1 : Les trois forme du HBV vu en microscope électronique ⁽⁴⁴⁾

Le virus de l'hépatite B est composé de 3 parties :

- Une **enveloppe** sur laquelle on retrouve l'antigène HBs (Ag HBs). Cet antigène HBs est l'élément spécifique du virus qui va activer le système immunitaire lors d'une infection.
- Une **coque** constituée de protéines (capside protéique) qui permet de protéger le virus de l'extérieur, contenant les antigènes HBc et HBe (Ag HBc et Ag HBe)
- Une **molécule d'acide désoxyribonucléique** qui est une molécule que l'on retrouve dans toutes les cellules vivantes (ADN). Cet ADN est très important car c'est le génome du virus et doit donc se transmettre en totalité ou en partie lors de la reproduction du virus.

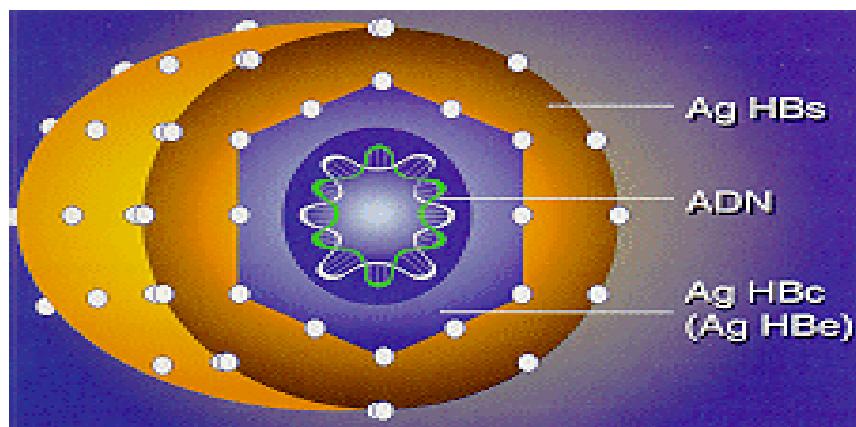


Figure2 : virus de l'hépatite B ⁽⁴⁵⁾

Le virus de l'hépatite B est l'un des plus petits génomes décrits, avec un ADN composé d'une nucléocapside entourée d'une bicouche lipidique sur laquelle s'insèrent les protéines de

surface ⁽¹⁸⁾. Le génome est un acide désoxyribonucléique (ADN) sphérique, partiellement double brin, non fermé de manière covalente.

3-2) Organisation du génome :

Avec ses 3 200 paires de bases, c'est le plus petit génome connu parmi les virus à ADN. Il code seulement pour 4 gènes :

- ✓ Le gène C (c = core) : constitué de l'antigène HBc et HBe. Le HBc associé à la capsid ou core, présent dans le noyau, induit l'activité cytolytique des lymphocytes T, mais il n'apparaît pas libre dans le sérum. L'antigène HBe est excrété dans le sérum, c'est un témoin de la réPLICATION virale.
- ✓ Le gène S (s = surface) : constitué d'antigène HBs. Il s'agit du principal marqueur sérique d'infection. Il est présent dans le cytoplasme des hépatocytes, constitue l'essentiel de l'enveloppe du virus, associé à une résistance importante du virus.
- ✓ Le gène P (p = polymérase) : plus précisément l'ADN polymérase qui intervient dans la multiplication du virus .
- ✓ Le gène X : La protéine X est dotée d'une faible activité oncogénique, et elle joue un rôle clé dans l'activation de l'expression des gènes du VHB, ainsi que la réPLICATION virale en agissant comme un Co-activateur transcriptionnel collaborant avec des facteurs de transcription cellulaire ^(19,20)

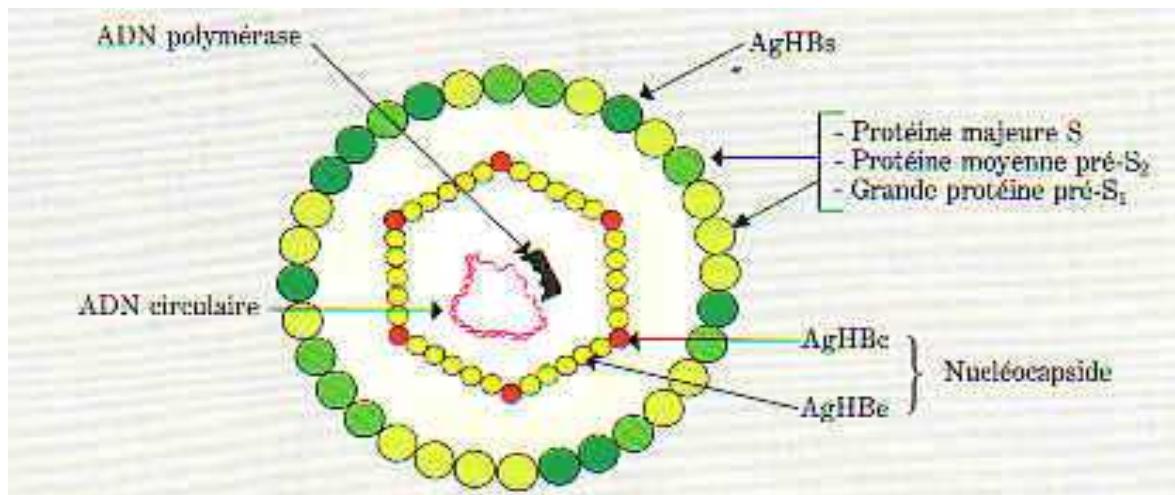


Figure3 : Virus de l'hépatite B (particule de Dane)⁽⁴⁶⁾

4) Cycle de réPLICATION du virus de l'hépatite B :

Le HBV est un virus strictement humain. Il se multiplie dans les hépatocytes. Il ne se réPILE pas in vitro dans les cultures cellulaires. ⁽²¹⁾

La première étape de la multiplication du VHB commence par l'attachement du virus sur la cellule cible (hépatocyte), et la fixation se fait par interaction entre l'antigène pré S1 (HBs)

côté virus et par l'albumine humaine polymérisée côté hépatocyte. La nature du récepteur de l'HBV n'est, toutefois, pas encore déterminée⁽²²⁾.

Lors de son entrée dans l'hépatocyte, le virus perd son enveloppe. La capside rejoint le noyau de l'hépatocyte et désassemble pour libérer son ADN.

L'ADN polymérase virale associée au virion complète l'ADN génomique partiellement bicaténaire en ADN bicaténaire circulaire su-enroulé (« supercoiled », torsadé). Celui-ci est transcrit par l'appareil cellulaire en ARN messagers, traduits en 4 protéines (agHBs, agHBc, ADN polymérase et protéine X) et **ARN prégénomique** (la particularité du HBV).

Ce dernier est rétrotranscrit par l'ADN polymérase en nouvel ADN génomique.

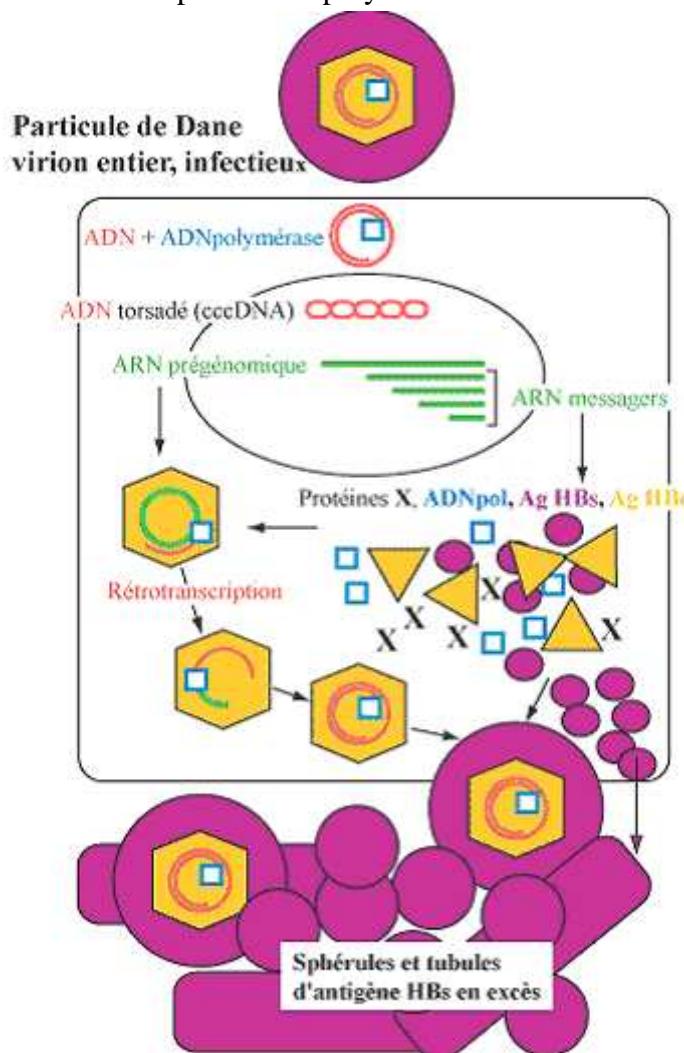


figure : cycle de réPLICATION du HBV⁽⁴⁷⁾

Le HBV est un virus ubiquitaire mais la répartition selon les génotypes est très variable dans le monde. Les études phylogénétiques menées à partir des séquences nucléotidiques de différents génomes viraux ont permis de classer le HBV en 8 génotypes (A-H)⁽²³⁾

5) Epidémiologie :

5-1 La prévalence de l'hépatite B à l'échelle mondiale :

La prévalence de VHB est de 5,4 % à l'échelle mondiale contre 1 % pour celle du VIH et 3 % pour celle du virus de l'hépatite C (24)

Le virus de l'hépatite B est de répartition ubiquitaire. La prévalence varie de 0,1% à 20 % selon les zones géographiques de sorte que l'OMS en distingue trois, avec des modes de transmission et des niveaux de risques différents (25) :

- 1) Les pays de haute endémie (Afrique noire, Asie du Sud-est) dans lesquels la majorité de la population a été en contact avec le virus et où environ 10 % de la population sont porteurs du virus,
 - 2) Les pays de faible endémie (Europe, Amérique du Nord, Japon) dans lesquels moins de 10 % de la population a été en contact avec le virus et moins de 1 % des sujets sont porteurs de virus
 - 3) Les pays de moyenne endémie où la situation est intermédiaire (Afrique du Nord, Europe de l'Est, Amérique du Sud).

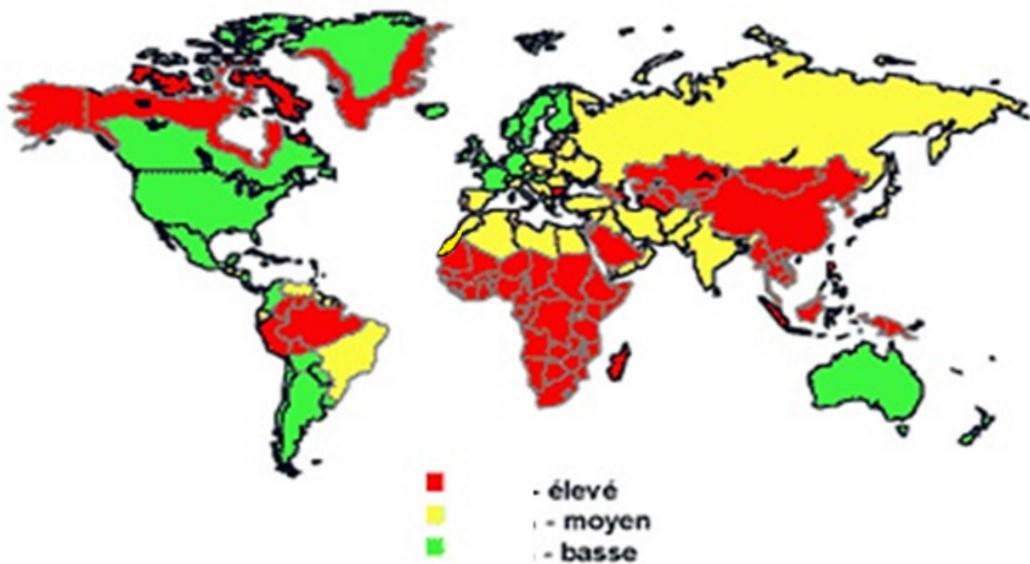


Figure 5: Répartition géographique de la prévalence de l'hépatite B (48)

5-2) La prévalence du génotype de l'Hépatite B :

La variabilité du génome du VHB a permis de classer la population humaine en génotypes dont la répartition à travers le monde est ubiquitaire. Actuellement huit génotypes sont identifiés, représentés de A à H⁽²³⁾ (Annexe1) Comme le montre la *figure 6*. Ces différents génotypes présentent une distribution géographique distincte ; par exemple, le génotype E prédomine en Afrique et le génotype B en Asie du Sud-Est alors que le génotype D est majoritairement dominant dans le bassin méditerranéen.

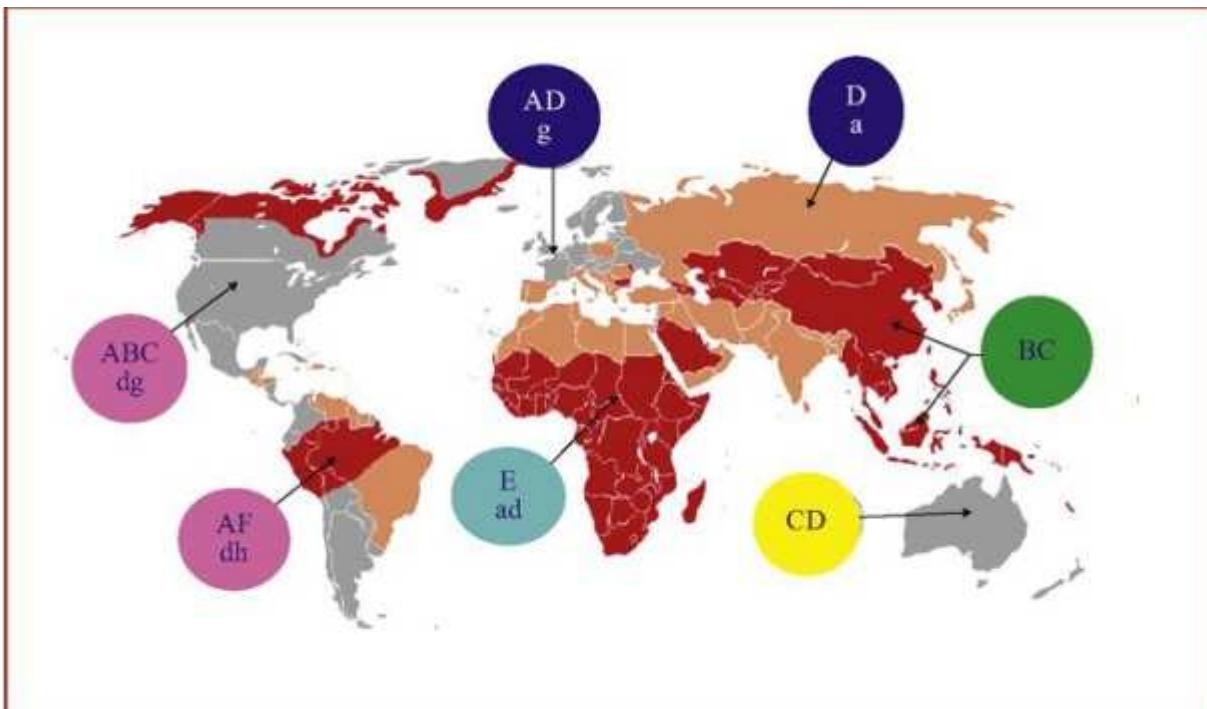


Figure 6: La Répartition géographique des génotypes du virus de l'hépatite B dans le monde ⁽⁴³⁾

5-3. La prévalence de l'hépatite B au Maroc :

En 2000, André ⁽²⁶⁾ a fait une étude comparative entre différents pays du monde, il a trouvé que la plupart des pays africains ont une endémicité élevée sauf le Maroc et la Tunisie qui font partie des zones d'endémicité intermédiaire.

L'épidémiologie du virus de l'hépatite B (VHB) n'est pas précisément connue au Maroc. L'étude d'André s'est penchée sur l'évaluation de la prévalence de l'infection par le VHB chez une population active marocaine, et la détermination des facteurs de risque chez les malades trouvés positifs pour l'AgHBs. Un effectif de 16634 volontaires dont 10003 sont de sexe masculin et 6631 de sexe féminin, était dépisté pour l'AgHBs. Le dépistage du VHB a été réalisé par le test d'Elisa (sérologie).

Un total de 276 personnes est trouvé positif au test de dépistage, ces résultats montrent que le Maroc est un pays à faible endémicité avec une prévalence du portage de l'AgHBs estimée actuellement à 1,66 % (2,16% chez les hommes 0,90%chez les femmes).

Cette étude démontre que la prévalence de l'Ag HBs est estimée actuellement à 1,66 % dans la population active marocaine. L'identification des facteurs de risque permet de dire que la prévention demeure la méthode la plus efficace pour contrôler avec succès l'infection par le VHB, ⁽²⁷⁾

La faible endémicité rapportée dans la présente étude montre le succès du programme national de vaccination contre le VHB. En effet, le Maroc fait partie des pays qui ont adhéré au programme de l'OMS pour la vaccination contre le VHB depuis 1999 ⁽²⁸⁾

Pour conclure, le VHB représente la 10ème cause de mortalité dans le monde et une des trois premières causes de décès en Asie et en Afrique. ⁽²⁹⁾

6-Mode de transmission (annexe 2) :

Les principaux modes de transmission jouent un rôle variable en fonction du degré de prévalence dans la zone concernée.

La contagiosité du VHB est liée à sa présence dans la plupart des liquides biologiques des sujets infectés : le sang (10^8 à 10^9 virions par millilitre), le sperme et les sécrétions vaginales (10^6 à 10^7 par millilitre), la salive (10^5 à 10^7 par millilitre), et à un titre plus faible dans le lait maternel et les urines, sachant que le VHB ne se transmet pas par l'air, l'eau ou les aliments ⁽³⁶⁾.

Cette contagiosité est également liée à la résistance du virus dans le milieu extérieur et à sa capacité de garder son pouvoir infectieux pendant plus de 7 jours à température ambiante. ^(31,30)

Selon l'OMS, le virus de l'hépatite B est 50 à 100 fois plus contaminant que le VIH.

Quatre modes de transmission sont classiquement identifiés ⁽³²⁾ :

- la transmission sexuelle : il s'agit aujourd'hui du principal mode de contamination. ⁽³³⁾
- la transmission parentérale : ce mode de transmission peut toucher le personnel soignant, lors d'accidents d'exposition au sang, aussi chez les usagers de drogue lors de l'échange de matériel infecté ...
- la transmission horizontale : par des contacts étroits avec des porteurs chroniques au sein de la famille ou en collectivité.
- la transmission périnatale : de la mère à l'enfant lors de l'accouchement par le sang ou d'autre liquides organiques (sperme, sécrétions vaginales, lait maternel). ^(33,34)

Le VHB reste virulent hors de l'organisme pendant sept jours ⁽³⁷⁾ et ni l'alcool, ni l'éther, ne le détruisent. La contamination peut donc intervenir dans des situations aussi bénignes que l'échange de coupe-ongles, de brosses à dents ou de rasoirs. Il est important de préciser que la source de l'infection n'est pas identifiée dans 35% des cas ⁽²⁵⁾.

7-Symptôme ⁽³⁸⁾

La plupart du temps, l'hépatite virale passe inaperçue, surtout si l'on est contaminé jeune, et quand il ya des symptômes, ils ne sont pas forcément très caractéristiques, ils peuvent ressembler aux symptômes de la grippe.

Parmi les symptômes de l'hépatite virale B :

- Une extrême fatigue
- Jaunissement de la peau et des yeux (ictère)
- Coloration foncée des urines et claire des selles
- Des nausées, vomissement et des douleurs abdominales.

8-Traitement :

Il n'existe pas de traitements spécifiques contre l'hépatite B. Certaines personnes atteintes de cette maladie peuvent être traitées avec des médicaments, dont l'interféron et les agents antiviraux ^(OMS)(des interféron sous forme pégylé , des analogues de nucléosides , inhibiteurs de la polymérase virale)⁽³⁹⁾ .

L'objectif du traitement de l'infection chronique virale B est de réduire le risque d'évolution vers la cirrhose. Cet objectif ne peut être atteint qu'en faisant régresser la lésion inflammatoire hépatique par un contrôle de la réPLICATION virale B ^(40,41)

9-Prévention :

Le vaccin est le pilier de la prévention contre l'hépatite B. L'OMS recommande de vacciner tous les nourrissons contre cette maladie dès que possible après la naissance, de préférence dans les 24 heures.

10-Vaccin

Le vaccin contre l'hépatite B est le premier et actuellement le seul vaccin contre un cancer humain qui est celui du foie ⁽⁴²⁾.

I-Matériel et méthodes :

A) Déduire la charge Virale à partir du sang du patient :

1) Prélèvements, transport et conservation des échantillons :

Les prélèvements de sang ont été recueillis stérilement dans des tubes à EDTA. Le matériel biologique utilisé dans cette étude c'est le plasma sanguin, obtenu après centrifugation (12000tr /min). Les plasmas non destinés à être utilisés dans les 72h, ont été congelés à - 20°C sous formes de parties aliquotées stérilement, de 800 à 1000µL dans des tubes en polypropylène avec bouchon à vis (de type Sarstedt).

***Teste de confirmation de l'hépatite B (sérologie) :**

Les patients qui font l'objet de notre étude, doivent d'abord réaliser un diagnostique de l'hépatite B par un test immuno-enzymatique de type ELISA qui se fait pas le kit « Murex HBsAg version 3, ABBOTT Diagnostic) qui consiste en la détection de l'Ag HBs.

Les patients positifs pour l'ELISA seront recontrôlés par un autre test de confirmation qui consiste en la détermination de la charge virale. Ce test est réalisé dans le service de biologie moléculaire au sein de l'institut Pasteur du Maroc en utilisant la plate forme automatisée de Roche Diagnostics : Cobas AmpliPrep et Cobas TaqMan 48, pilotés tous les deux par le logiciel AmpliLink.

La détermination de la charge virale est réalisée dans le but d'un bilan préthérapeutique qui permet de suivre l'efficacité du traitement adopté.

2. Extraction automatisée par le COBAS AmpliPrep :

Le but de l'extraction est d'obtenir des acides nucléiques plus ou moins purs et plus ou moins concentrés.

Le système d'extraction des acides nucléiques par le Cobas Ampliprep, utilise la technologie en billes magnétiques entourées de silicate. Les particules virales du VHB sont lysées par un tampon de lyse (Citrate de sodium dihydraté, 42,5% de thiocyanate de guanidine <5% de polydocanol , 0,9% de dithiothréitol) permettant la libération des acides nucléiques qui se fixent sur les billes magnétiques entourées de silicate.

Le système est composé d'un aimant qui permet l'accrochage des acides nucléiques pendant les étapes de lavages (Citrate de sodium sihydraté, <0,1% de N-méthlisothiazolone-HCl).

Les acides nucléiques sont libérés par la suite en utilisant un tampon d'élution (0,2% de méthylparabéne).

3. Amplification et détection de l'ADN viral par PCR en temps réel (Cobas TaqMan 48):

L'analyseur COBAS TaqMan 48 est un système entièrement automatisé pour l'amplification et la détection d'acides nucléiques en utilisant la technologie de la 5' exonucléase utilisant les sondes TaqMan.

3.1. Principe de la méthode :

La sonde TaqMan présente deux fluorophores: un à l'extrémité 5' de la sonde (fluorophore donneur) et l'autre à l'extrémité 3' de la sonde (fluorophore "extincteur" ou quencher). "L'extincteur" étant à proximité du donneur, inhibe l'émission de fluorescence par ce dernier. Au cours de l'amplification, l'activité 5' exonucléase de la Taq DNA polymérase dégrade la sonde (dans la direction 5'→3').

Le fluorophore donneur sera dégagé de l'action de l'extincteur et émettra un signal fluorescent mesurable par l'instrument. Le suivi en temps réel de la fluorescence accumulée permet la quantification du produit PCR.

3.2. Amplification de la cible :

Les échantillons traités ainsi que des standards de quantification (SQ) sont ajoutés au mélange d'amplification dans des tubes d'amplification (tubes K), dans lesquels se produit l'amplification PCR. Le SQ permet de quantifier la charge virale mais sert également de témoin de la PCR. Le thermocycleur de l'analyseur chauffe le mélange afin de dénaturer l'ADN bicaténaire et d'exposer les séquences cibles de l'amorce spécifique sur l'ADN génomique circulaire du VHB et sur l'ADN du SQ VHB (la dénaturation).

Au fur et à mesure du refroidissement du mélange, les amorces s'hybrident à l'ADN cible (hybridation).

L'ADN polymérase thermostable *Thermus specie Z05* ADN, en présence de Mn²⁺ et d'un excès de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP), dont la désoxyadénosine triphosphate, désoxyguanosine triphosphate, désoxycytidine triphosphate et la désoxyuridine triphosphate (au lieu de la thymidine), étend les amorces hybridées (élongation).

L'analyseur TaqMan répète automatiquement cette opération au cours d'un nombre défini de cycles préprogrammé dans l'analyseur, chacun devant doubler la quantité d'amplicon ADN produits. L'amplification ne concerne que la région du génome VHB située entre les amorces ; le génome VHB entier n'est pas amplifié.

3.3. Détection des produits PCR dans un test COBAS TaqMan 48 :

Le test TaqMan utilise une technologie PCR en temps réel, l'utilisation de sondes fluorescentes à double marquage permet une détection en temps réel de l'accumulation des produits PCR en surveillant l'intensité de l'émission des colorants fluorescents rapporteurs libérés pendant le processus d'amplification. Les sondes consistent en des oligonucléotides spécifiques du VHB et du SQ VHB marqués par un colorant rapporteur et par un colorant extincteur. Dans ce test, les sondes du VHB et du SQ sont marquées par différents colorants rapporteurs de fluorescence. Lorsque les amorces à colorants à double fluorescence sont intactes, la fluorescence du rapporteur est supprimée en raison de la proximité du colorant extincteur et à cause des effets Förster de transfert d'énergie.

Pendant la phase PCR, la sonde hybride une séquence cible et se trouve clivée par l'activité de la nucléase 5'→3' de l'ADN-P Z05 thermostable. Une fois que les colorants rapporteur et extincteur sont libérés et séparés, l'extinction ne se produit plus et la fluorescence du colorant rapporteur augmente. L'amplification de l'ADN VHB et ADN du SQ est mesurée indépendamment à des longueurs d'ondes différentes.

Ce processus est répété pendant le nombre de cycles préprogrammés dans l'analyseur, augmentant ainsi l'intensité de l'émission des colorants rapporteurs individuels, permettant une identification indépendante de l'ADN VHB et ADN du SQ. L'intensité des signaux est fonction de la quantité initiale du matériel au commencement de la PCR.

Les copies ne sont pas une unité internationale. Elle ne permet pas d'équivalence d'un pays à l'autre, d'où l'utilité de l'expression d'un même résultat en log.

Le log est une expression mathématique donc un langage international. Plus récemment, l'OMS a validé l'expression en UI qui est un langage commun, uniforme et standardisé.

Ce langage commun à tous, est une nécessité pour la recherche. La concentration d'ADN du HBV est exprimée en Unités Internationales (UI/ml). Le coefficient de conversion du nombre de copies/ml de HBV en UI/ml de HBV est de 5,82 copies/UI en utilisant les normes internationales d'ADN du virus de l'hépatite B établies par l'OMS pour les dosages par les techniques à acide nucléique.

Les variations croissantes ou décroissantes de la charge virale peuvent aussi s'exprimer sous forme de 1 log, 2 log, etc.

La figure suivante illustre un exemple d'un patient avec une charge virale positive.

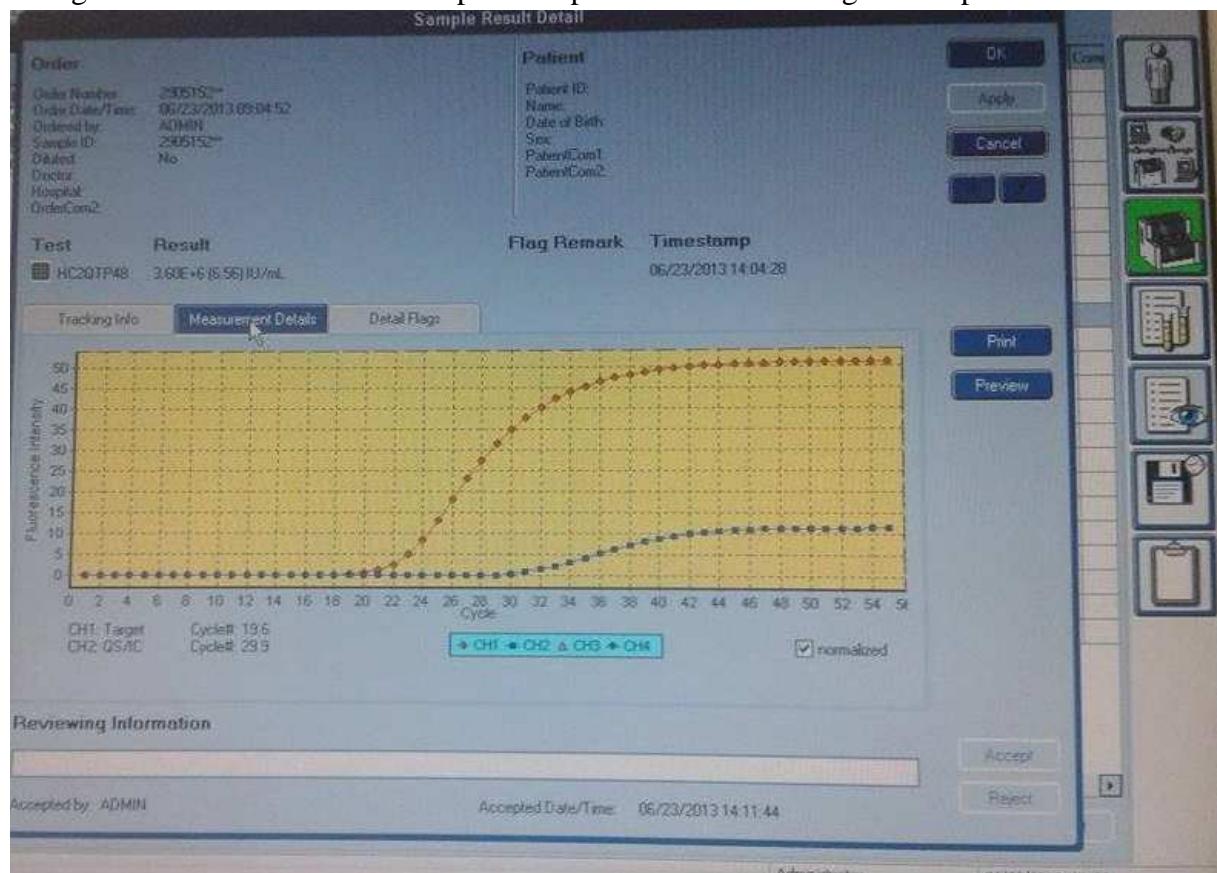


Figure 7:résultat d'un patient à une charge Virale positive (Amplilink)

Résultats et discussion

Les plasmas des différents prélèvements, sont accompagnés d'un listing sur papier à partir duquel, les données ont été saisies dans une base de données et exploités sous Excel.

Les résultats obtenus (durant toute la période de stage) sont présentés dans le tableau suivant :

1- Répartition globale selon le sexe et log :

Tableau 1 : Répartition globale des patients HBV positifs selon le sexe et log.

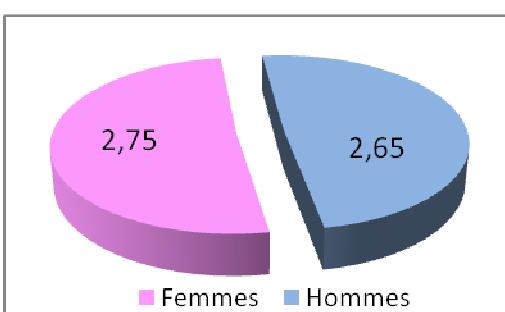
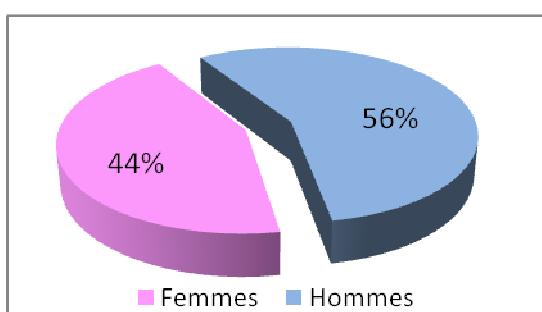
	Total sexe	Total de log	Moyenne de log
Femmes	14	38,49	2,75
Hommes	18	47,67	2,65
Total	32	86,16	2,7
Ecart type	2,83	6,49	0,07

Sur les 32 personnes recrutées et positives, il ya plus d'hommes (56%) que de femme (44%), ces résultats montrent une prévalence plus élevée chez les hommes.

Un résultat comparable a été observé en France.

La forte prévalence chez les hommes par rapport aux femmes a été décrite en France en 2005 par Antona et al. Cette dernière suscite des questions sur la susceptibilité à l'infection selon le genre et/ou la différence de réponse immunitaire à l'infection.

La représentation de ces résultats sus forme de Camembert est illustrée dans les figures suivantes :



2-Répartition de l'infection par âge et par sexe :

Tableau 2 : répartition des patients HBV positifs selon l'âge et le sexe

	Femmes	Hommes	Total	Ecart type	Total +ou- Ecart type
< de 24 ans	0	1	1	0,71	1,00
Entre 24 et 34	2	5	7	2,12	8,00
Entre 35 et 44	3	6	9	2,12	9,00
Entre 45 et 54	4	3	7	0,71	7,00
De 55 et plus	5	3	8	1,41	9,00
Total	14	18	32	2,83	31,00
Ecart type	1,92	1,95	3,13	0,71	

Comme le montre la figure 3, l'étude de la prévalence du HBV selon les critères d'âge et du sexe montre que la classe d'âge prédominante pour les hommes est celle de 35-44ans et pour les femmes 55ans et plus. On constate que les hommes sont les plus touchés.

Ces résultats réaffirment les constatations antérieures et confirment que les hommes sont plus touchés par le VHB que les femmes.

En effet, des résultats similaires ont été trouvés en 2003 par Alter et al, après une étude faite en Europe. Des résultats comparables ont été obtenus en 2009 par Romano et al en Italie et en 2010 par Ben Alaya et al, suite à une étude réalisée en Tunisie.

La représentation de ces résultats sous forme d'histogramme est illustrée dans la figure suivante :

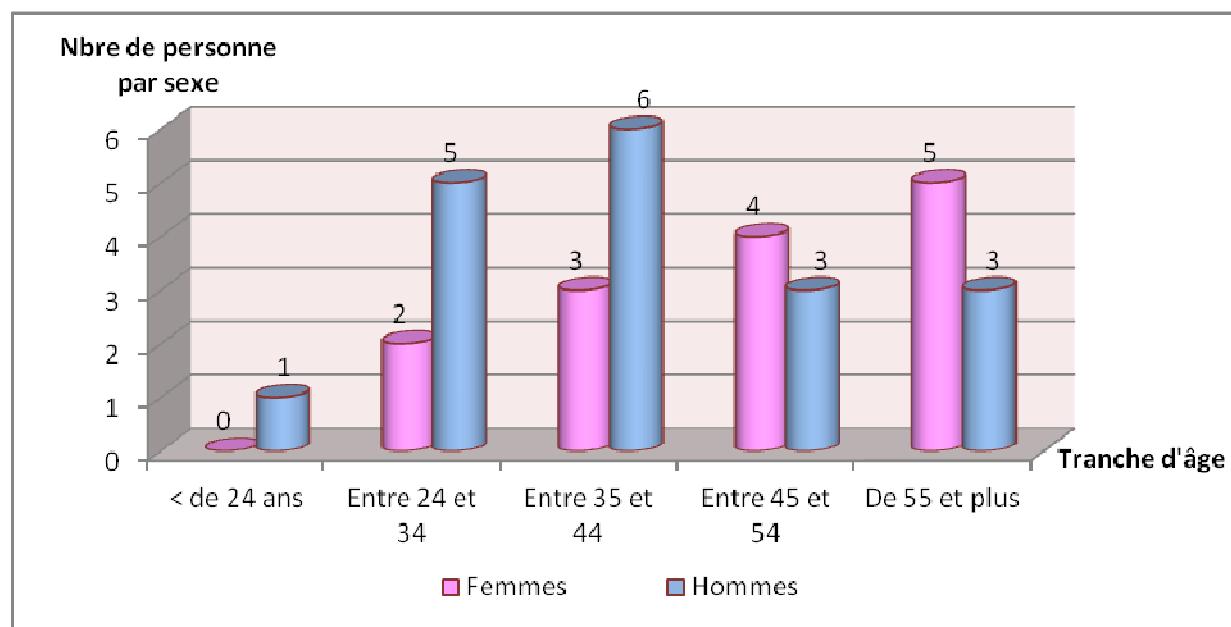


Figure 10 : La répartition de l'infection selon le sexe et l'âge

3-Répartition par moyenne de log selon le sexe et l'âge :

Cette répartition est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 3 : répartition des patients HBV positifs par moyenne de log selon le sexe et l'âge.

	Femmes	Hommes	Total	Moyenne de log par âge	Ecart type
< de 24 ans	0,00	1,86	1,86	0,93	1,32
Entre 24 et 34	3,31	2,97	6,28	3,14	0,24
Entre 35 et 44	2,45	2,74	5,19	2,60	0,21
Entre 45 et 54	2,66	2,27	4,93	2,47	0,28
De 55 et plus	2,82	2,56	5,38	2,69	0,18
Total	11,24	12,40	23,64	11,82	0,82
Moyenne par sexe	2,25	2,48	4,73	2,36	0,16
Ecart type	1,30	0,43	1,68	0,84	0,49

L’analyse de ces résultats montre que la répartition de la prévalence de HBV chez cette population étudiée, est hétérogène selon les cinq tranches d’âges étudiées.

La moyenne des charges virales pour les deux sexes est de 2log, ce qui concorde avec l’étude d’André en 2000

Une charge virale faible, (négative chez les femmes) a été observée chez les sujets âgés de moins de 24 ans. Ceci peut être expliqué par le fait que cette tranche d’âge regroupe dans sa majorité les enfants ayant bénéficié d’une vaccination systématique dès leur jeune âge selon le programme de l’OMS.

La charge virale la plus importante, et observée chez les sujets âgés entre 24 et 34. Elle est moins importante au niveau des autres tranches.

Ce résultat ne concorde pas avec la statistique réalisées dans notre étude pour l’année 2013 (annexe3) et également avec l’étude faite en France par l’institut de veille sanitaire entre 2003-2004 (Antona 2006).

La représentation de ces résultats sous forme d’histogramme est illustrée dans la figure 4.

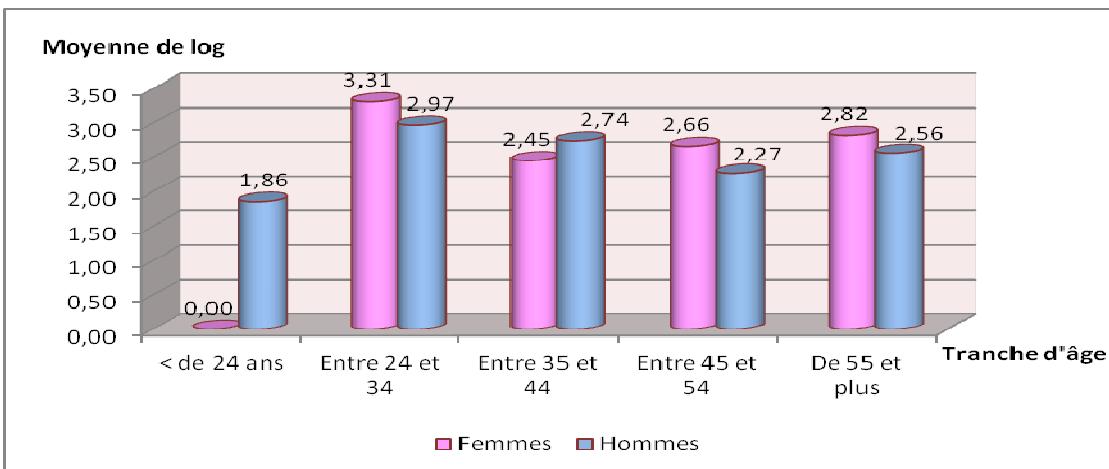


Figure 11 : répartition de la charge virale (log) selon les tranches d'âge et le sexe.

Références

- (1) Khuroo M S. Viral hepatitis in international travellers: risks and prevention. International Journal of Antimicrobial Agents 2003; 21 : 143-152.
- (2) Zoulim F. Nouveaux tests virologiques et leurs applications dans la prise en charge de l'hépatite B chronique. Presse Med. 2006; 35: 317-326.
- (3) Chams V, Fournier-Wirth C, Chabanel A, Hervé P, Trépo C. Le virus GB-C ou virus « dit » de l'hépatite G est-il impliqué en pathologie humaine ? Transfusion Clinique et Biologique 2003 ; 10: 292–306.
- (4) Ramezani A, Gachkar L, Eslamifar A et al. Detection of hepatitis G virus envelope protein E2 antibody in blood donors. International Journal of Infectious Diseases 2008 ;12 : 57—61.
- (5) Maaref F, Kilani B, Ammari Let al . Prévalence de l'hépatite G et des hépatites virales B et C dans la population VIH (+) de l'hôpital La Rabta, Tunis, Tunisie. Pathologie Biologie Pathol Biol 2009 ; doi:10.1016/j.patbio.2009.10.002.
- (6) ¹ Hepatitis B Foundation, Hepatitis B fast Facts.
2009. http://www.hepb.org/patients/general_information.htm. Consulté le 19/03/09
- (7) ² World Health Organization, Hepatitis B factsheet.
2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Consulté le 19/03/09
- (8) ³ World Health Organization, Hepatitis B factsheet.
2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Consulté le 19/03/09
- (9) ⁴ InVS. Infection par le virus de l'hépatite B. http://www.invs.sante.fr/surveillance/hepatite_b/donnees.htm. Consulté le 19/03/09
- (10) WHO, W. H. O. (2002). Hepatitis B World Health Organization. . In *Department of Communicable Diseases Surveillance Response*
- (11) Lavanchy, D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* **11**, 97-107.
- 12) Lok, A. S. (2002). Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **346**, 1682-1683.
- 13) Alter HJ, Blumberg BS. Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia antigen) Blood 1966; 27: 297–309.

- 14) Blumberg B.S et al. A Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrome Leukemia and Hepatitis. *Annals of Internal Medicine*. 1967 ; 924-931.
- 15) Denis François. Les virus transmissibles de la mère à l'enfant. Edition John Libbey Eurotexte. 1999; 461.
- 16)Maiga I, Venard V, Muller C, Le Faou A: **Evolution du virus de l'hépatite B.** *Bull Soc Fr Microbiol* 2003, **18**:281-286
- 17) Robertson BH, Margolis HS: **Primate hepatitis B viruses-genetic diversity, geography and evolution.** *Rev Med Virol* 2004, **12**:133-141
- 18) Wagner A, Denis F, Ranger-Rogez et all. Génotype du virus de l'hépatite B. Immuno-analyse et Biologie spécialisée 2004 ; 19 : 330-342.
- 19) Kim JH, Sohn SY, Benedict Yen ST, Ahn BY. Ubiquitin-dependent and -independent proteasomal degradation of hepatitis B virus X protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 366:1036–1042.
- 20)Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathologie Biologie* 2010 ; 58: 267–272.
- 21) inrs mis a jour septembre 2011
[http://www.inrs.fr/eficatt/eficatt.nsf/\(allDocParRef\)/FCVHB?OpenDocument](http://www.inrs.fr/eficatt/eficatt.nsf/(allDocParRef)/FCVHB?OpenDocument)
- 22) Le Duff Y, Blanchet M, Sureau C. The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *J Virol*. 2009 ; 83 : 12443–12451
- 23) Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H. & Magnus, L. O. (2002). Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* **83**, 2059-2073.
- 24) S. Bristol-Myers
Hépatite B : mieux la connaître pour mieux la traiter
J Pediatr Pueric, 19 (2006), pp. 340–343
- 25)) WHO [en ligne] Hepatitis B, World Health Organization Department of Communicable Diseases Surveillance and Response, 2002. To find this document : WHO > Programmes and projects > Epidemic and

26) F. André

Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa

Vaccine, 18 (2000), pp. 20–22

27)<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.elsevier-72b982e6-eec4-39ab-ad90-14b6b404bdec>

28) Barkat A, Braikat M, Lamdouar Bouazzaoui N. Calendrier national de vaccination : évolution et perspectives. Available from: <http://www.santemaghreb.com>.

29)<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/index3.html>

30) INSERM [en ligne]. Hépatites virales, dépistage, prévention, traitement. INSERM 1997.

31) Van Herck K, Vorsters A, VanDamme P. Prevention of viral hepatitis (B and C) reassessed. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2008 ; 22 : 1009-1029

32) Centers for Disease control and prevention. CDC Division of Viral Hepatitis: hepatitis B Information for the Public. September 11, 2008. <http://www.cdc.gov/hepatitis/B/bFAQ.htm>. Consulté le 28/04/09

33) Liaw, Y. F. & Chu, C. M. (2009). Hepatitis B virus infection. *Lancet* **373**, 582-592.

34) Van Herck, K., Vorsters, A. & Van Damme, P. (2008). Prevention of viral hepatitis (B and C) reassessed. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **22**, 1009-1029.

35) Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G et al. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. Journal of Virological Methods 1998; 72: 163-174.

36)OMS Genève. Introduction du vaccin contre l'hépatite B dans les services de vaccination infantile. WHO/V&B/01.31. 2002 Available from: <http://www.who.int/vaccines-documents/>.

37) World Health Organization, Hepatitis B factsheet n° 204. Revised August 2008.<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Consulté le 19/03/09

38) Patrick Marellin thomas Laurenceau , Dialogue Médecin-Malade , Hépatite B : prévenir,détecter,traiter John Libbey Eurotext , 2009
<http://books.google.fr/books/john-libbey-eurotext?q=hepatie+B&hl=fr&vid=ISBN9782742007424&btnG=OK#v=onepage&q&f=false>

- 39) Zoulim F. Données actuelles sur le traitement de l'hépatite B chronique. Presse Med. 2008; 37: 287–293.
- 40) Ajana F. L'hépatite virale B, encore et toujours d'actualité. Archives de pédiatrie. 2006 ; 13 :1269–1274.
- 41)Kahloun A, Bourlière M, Zoulim Z. Bithérapie par analogues dans le traitement de l'hépatite chronique B : de novo ou en cas d'échec Gastroentérologie Clinique et Biologique 2010 ; 34 : 126-135.
- 42)Pineau P, Tiollais P. La vaccination : atout majeur dans la lutte contre le cancer du foie induit par le virus de l'hépatite B. Pathologie Biologie 2010 ; 58 :444–453.
- 43) Ducancelle A, Pivert A, Lunel-Fabiani F. Les mutants précore et du promoteur basal du core du virus de l'hépatite B. Virologie 2011; 15: 100-114.
- 44) <http://devsante.org/base-documentaire/medecine/structure-et-replication-du-virus-de-lhepatite-b-0>
(Jean-Marie Huraux , Mis à jour le 14 Février 2001)
- 45) <http://www.hepatoweb.com/hepatite-B-virus.php>
- 46) http://exp.gen.free.fr/SOIREES/DOCS/hepatites/pages/hep_virol.htm
- 47) Huraux J M. Virologie. Faculté de médecine Pierre et marie curie, Université Paris-VI. DCEM1 : 2006-2007.
- 48)Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. Pathologie Biologie 2010 ; 58 : 273-277.

Annexe (1) : les caractéristiques des différentes hépatites

Hépatite A		Hépatite B	Hépatite C	Hépatite D	Hépatite E
Famille	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	Viroidsviridae	Hepeviridae
Génotypes	3 génotypes (I à III)	8 génotypes (A à H)	6 génotypes (1 à 6)	3 génotypes (I à III)	4 génotypes (I à IV)
Acide nucléique	ARN monocaténaire linéaire	ADN circulaire partiellement bicaténaire	ARN monocaténair e linéaire	ARN satellite de l'HBV	ARN monocaténai re Linéaire
Enveloppe	Non	Oui	Oui	oui (celle de l'HBV)	Non
Transmission	oro-fécale	sanguine, sexuelle, materno-fœtale	sanguine	sanguine	oro-fécale
Chronicité	Jamais	Souvent	Très Souvent	Très Souvent	Jamais

Annexe (2) : transmission en fonction du type de l'hépatite

Virus	Modes de transmission	Symptômes	Mesures de protection
Hépatite A	<ul style="list-style-type: none"> - Transmission, la plupart du temps, par une exposition à de l'eau contaminée ou à des aliments préparés avec de l'eau contaminée - Transmission par voie oro-fécale (c.-à-d. lorsque des selles contaminées se retrouve dans la bouche d'une personne à cause d'un mauvais lavage des mains ou que des selles contenant l'hépatite A contaminent de l'eau qui est ensuite consommée) 	<ul style="list-style-type: none"> - Jaunisse (coloration jaune de la peau et des yeux) - Malaises - Perte d'appétit - Maux d'estomac - Urines foncées - Fatigue - La plupart des personnes infectées par l'hépatite A se rétablissent naturellement. 	<ul style="list-style-type: none"> - Vaccin contre l'hépatite A - Se laver les mains adéquatement avant et après la préparation et la consommation d'aliments
Hépatite B	<ul style="list-style-type: none"> - Exposition à du sang ou à des organes contaminés - Relations sexuelles - Transmission de la mère à l'enfant - Partage d'articles personnels avec une personne infectée (brosse à dents, rasoir, coupe-ongles, aiguille, matériel pour renifler de la drogue) 	<ul style="list-style-type: none"> - Jaunisse - Malaises - Perte d'appétit - Maux d'estomac - Urines foncées - Fatigue - Absence de symptômes possible (au moins 30 %) 	<ul style="list-style-type: none"> - Vaccin contre l'hépatite B - Relations sexuelles protégées - Éviter de partager des articles qui peuvent être contaminés avec du sang (brosse à dents, rasoir, coupe-ongles, aiguille, matériel pour renifler de la drogue)

		des cas graves ne présentent aucun symptôme)	
Hépatite C	<ul style="list-style-type: none"> - Exposition à du sang ou à des produits sanguins contaminés - Transmission de la mère à l'enfant - Relations sexuelles (dans de rares cas) - Partage d'articles personnels avec une personne infectée (brosse à dents, rasoirs, coupe-ongles, aiguilles, matériel pour renifler de la drogue) 	<ul style="list-style-type: none"> - La majorité des cas ne présentent aucun symptôme - Possibilité de jaunisse - Malaises - Perte d'appétit - Maux d'estomac - Urines foncées - Fatigue 	<ul style="list-style-type: none"> - Éviter de partager des articles qui peuvent être contaminés avec du sang (brosses à dents, rasoirs, coupe-ongles, aiguilles, matériel pour renifler de la drogue)
Hépatite D	<ul style="list-style-type: none"> - N'apparaît habituellement que chez les personnes déjà infectées par l'hépatite B - Exposition à du sang contaminé et, dans de rares cas, transmission par les relations sexuelles - Partage d'articles personnels contaminés 	<ul style="list-style-type: none"> - Jaunisse - Malaises - Perte d'appétit - Douleur dans la région de l'estomac - Urines foncées - Fatigue - Absence de symptômes possible 	<ul style="list-style-type: none"> - Vaccin contre l'hépatite B - Relations sexuelles protégées - Éviter de partager des articles qui peuvent être contaminés avec du sang (brosse à dents, rasoir, coupe-ongles, aiguilles, matériel pour renifler de la drogue)

Hépatite E	<ul style="list-style-type: none"> - Répandue dans les pays en développement - Transmission par voie oro-fécale (c.-à-d. lorsque des selles contaminées se retrouve dans la bouche d'une personne à cause d'un mauvais lavage des mains ou que des selles contenant l'hépatite A contaminent de l'eau qui est ensuite consommée) - Transmission la plupart du temps par une exposition à de l'eau contaminée ou à des aliments préparés avec de l'eau contaminée - L'hépatite E peut être transmise de la mère à l'enfant, mais elle est plus fréquente chez les adultes 	<ul style="list-style-type: none"> - Jaunisse - Malaises - Perte d'appétit - Maux d'estomac - Urines foncées - Fatigue - 90 % des enfants infectés par l'hépatite E ne présentent aucun symptôme 	<ul style="list-style-type: none"> - Se laver les mains adéquatement avant et après la préparation et la consommation d'aliments - Redoubler de vigilance dans les pays en développement
Hépatite G	<ul style="list-style-type: none"> - Les sujets atteints sont souvent coinfestés par d'autres virus, comme l'hépatite C, l'hépatite B et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) - Exposition à du sang ou à des produits sanguins infectés - Transmission possible par le partage d'articles personnels contaminés par le virus - Transmission possible de la mère à l'enfant à la naissance - Transmission possible pendant les relations sexuelles 	Absence de symptômes	<ul style="list-style-type: none"> - Vaccin contre l'hépatite B - Relations sexuelles protégées - Éviter de partager des articles qui peuvent être contaminés avec du sang (brosse à dents, rasoir, coupe-ongles, aiguilles, matériel pour renifler de la drogue)

Annexe (3) : Etude statistique du HBV (2013)

	Femmes	Hommes	Total	Moyenne de log par âge	Ecart type
< de 24 ans	0.00	2.75	2.75	1.38	1.94
Entre 24 et 34	2.90	2.82	5.72	2.86	0.06
Entre 35 et 44	3.19	2.78	5.97	2.99	0.29
Entre 45 et 54	3.12	2.77	5.89	2.95	0.25
De 55 et plus	3.18	2.82	6.00	3.00	0.25
Total	12.39	13.94	26.33	13.17	1.10
Moyenne par sexe	2.48	2.79	5.27	2.63	0.22
Ecart type	1.39	0.03	1.41	0.71	0.78

l'histogramme et le camembert du tableau antérieur

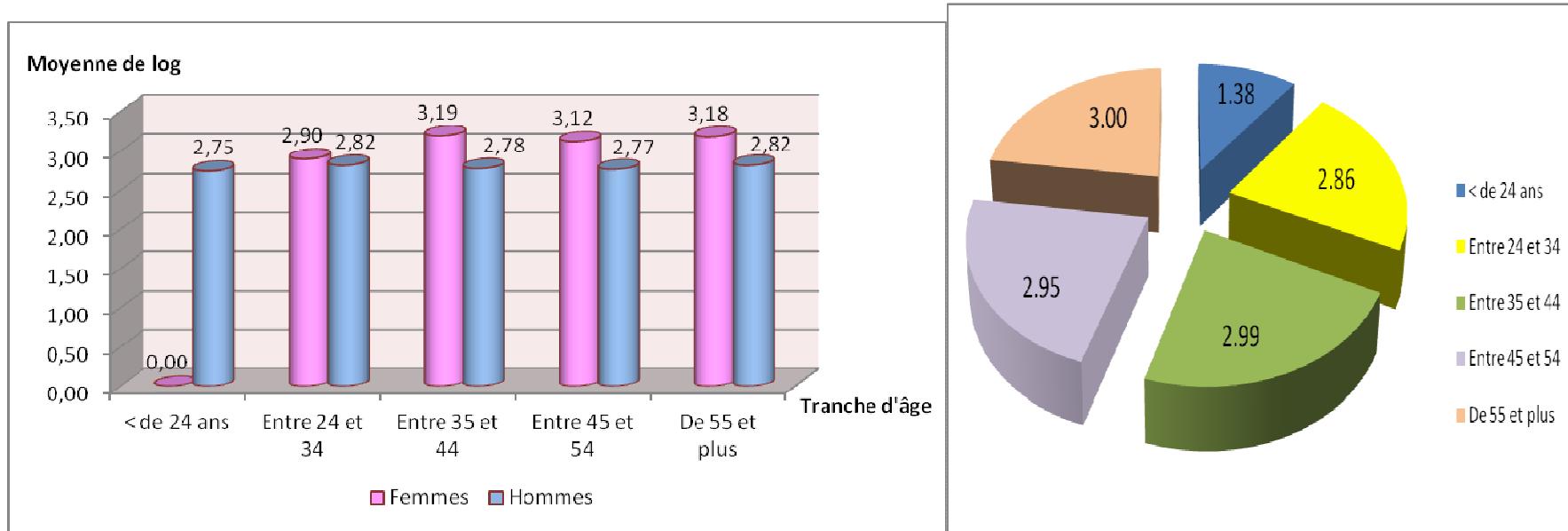


Figure 12 : Répartition de l'infection selon les tranches d'âge et la moyenne du log(2013)