
**APPORT DE LA QUANTIFICATION DE LA CHARGE
VIRALE DANS LA PRISE EN CHARGE DES PORTEURS
CHRONIQUES DE L'HEPATITE B.**

Résumé

Résumé

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) constitue un problème majeur de santé publique au niveau mondial. Cependant, la prise en charge d'une infection chronique inclut de façon parallèle le contrôle de la réplication par les analogues nucléos(t)idiques et la surveillance de l'efficacité du traitement qui se traduit par l'obtention d'une indétectabilité de l'ADN du VHB à l'absence de résistance.

Des taux très élevés de la charge virale reflètent souvent une mauvaise prise en charge et un risque d'évolution de la maladie vers la cirrhose. C'est à ce titre que nous avons étudié l'apport de la quantification de la charge virale dans la prise en charge des porteurs chroniques d'hépatite B suivis sous traitement à l'hôpital principal de Dakar.

Nous avons d'abord quantifié la charge virale de 874 sujets par la PCR en temps réel en utilisant le TaqMan 48 puis décrit le profil virologique. Nous avons ensuite réalisé de test d'association entre la charge virale et l'âge d'une part, puis la charge virale et le sexe d'autre part.

Nos résultats issus de la PCR en temps réel ont révélé les profils de charge virale ci-dessous :

« **Indétectable** » lorsque la Charge Virale = 0, soit 38% de la population d'étude.

« **Inférieur au seuil** » lorsque la Charge Virale < 20 UI/ml, soit 13.2% de la population d'étude.

« **Basse** » lorsque $20 \text{ UI/ml} < CV < 1000 \text{ UI/ml}$, soit 7.4 % de la population d'étude.

« **Intermédiaire** » lorsque $1000 \text{ UI/ml} < CV < 10000 \text{ UI/ml}$, soit 22.3% de la population.

« **Elevée** » lorsque $10000 \text{ UI/ml} < CV < 100000 \text{ UI/ml}$, soit 16% de la population d'étude.

« **Très Elevée** » lorsque $CV > 100000 \text{ UI/ml}$, soit 3.1% de la population d'étude.

Les résultats issus de nos tests d'association ont montré qu'il existe :

_ Une très forte association significative entre le profil « Indetecttable » et l'âge (**p = 0,001**) ;

_ Une association significative entre la charge virale « Elevée » et l'âge (**p = 0,008**).

_ Une association significative entre la charge virale « Très Elevée » et le sexe (**p = 0,023**).

Ces résultats nous ont permis d'élaborer des plans d'actions ciblés pour endiguer cette endémie d'hépatite B. Parmi ces stratégies, on peut citer :

- ❖ La sensibilisation des jeunes sur les risques liés à la transmission sexuelle afin de réduire la propagation de la maladie.
- ❖ La lutte contre la transmission sexuelle du virus par le port de préservatif lors des rapports sexuels, surtout chez les hommes à risque.

Ce travail contribue à l'élimination de l'hépatite B comme menace de santé publique à l'échelle nationale, ce qui témoigne le caractère essentiel de la quantification de la charge virale dans la prise en charge des hépatites.

Résumé

Mots clés : Hépatite B Chronique, prise en charge, charge virale, PCR en temps réel et Taqman 48.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire,

A Allah, le créateur et maître de l'univers sans oublier de Lui rendre grâce pour la force, le courage, la patience et la santé nécessaire qu'il m'a accordé pour accomplir ce travail, et à son Prophète Mohamed (P.S.L). Guide-nous sur le droit chemin comblé de faveur. Amine !

*A ma maman **Khoudia Samb,***

J'ai toujours eu auprès de vous toute l'affection et l'amour d'une bonne mère. Que de chemin parcouru depuis un certain mois d'Aout 1990. Vous avez pris le courage entre vos deux mains pour l'instruction et la quête de moyens de subsistance pour vos enfants en commençant par ma personne. J'ai toujours admiré votre humilité, votre bonté et votre sagesse. Aujourd'hui une étape se termine mais c'est aussi le début d'une autre et plus que jamais j'ai besoin de vous. Que Dieu vous prête Maman, une très longue vie et beaucoup de santé. Je vous adore maman.

*A mon père **Talla Sene,***

J'ai appris par vous la Crainte de Dieu, le pardon et la générosité. Ces écrits sont insignifiants pour vous gratifier toute ma reconnaissance et mon immense fierté de la qualité de l'éducation reçue. Ce travail est le vôtre. Que le tout puissant vous accorde une longue vie pleine de santé.

*A Mon oncle **Waly Samb,***

Les principes de vie que vous m'avez enseignés ainsi que l'affection que vous m'avez accordée durant mon enfance m'ont beaucoup aidé ; que ce travail soit la récompense de tous vos efforts consentis. Que dieu le tout puissant vous garde longtemps parmi nous. Peu de gens savent que vous n'êtes pas mon père car vous l'avez été quand ce dernier était loin de moi et je vous ai toujours considéré comme tel. Ce travail est le vôtre et qu'il vous remplisse de fierté.

A mes frères et sœurs : Bakar Sene ; Ndeye Penda Sene ; Astou Sene ; Adama Sene ; Awa Sene et Khady Sene. Vous m'avez toujours soutenu durant tout le long de mes études. J'ai trouvé auprès de vous toute l'affection et l'amour nécessaire à mon épanouissement. Merci pour tous et soyez rassurés de ma profonde gratitude.

*A mon oncle, feu **Alassane Bané Samb et toute sa famille,** Je ne saurais oublier les soutiens que vous m'avez apportés, et particulièrement ma tante Sokhna Niang, mes cousins et cousines.*

Que ce travail soit la récompense de vos efforts déployés. Que la terre lui soit légère. Amine

A toute la famille Sene, Je ne saurais oublier les soutiens que vous m'avez apportés. Recevez par cette mémoire l'expression de mes sentiments de reconnaissance.

A tous mes amis, votre soutien et conseil d'amis ne m'ont pas manqué; recevez par ce mémoire l'expression de mes sentiments les plus distingués.

Remerciements

Je tiens, en premier lieu, à remercier les membres de ce jury qui me font l'honneur de juger ce travail de mémoire :

Professeur Mady Ndiaye,

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider ce jury de mémoire.

Professeur Abdoulaye Diop,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury en tant qu'examineur externe. Veuillez accepter l'assurance de mon profond respect et de ma gratitude.

Docteur Pape Silman Diawara,

Je vous remercie pour m'avoir offert l'opportunité de travailler sur un sujet aussi passionnant que celui-ci, de m'avoir accueilli dans son laboratoire au cours de mon stage et d'avoir dirigé ce travail. Vous m'avez fait l'honneur de suivre ce travail au cours de mon stage et de ma rédaction de mémoire. Je vous remercie encore une nouvelle fois d'avoir accepté de juger ce travail en tant que directeur de mémoire. Merci pour votre disponibilité et votre bienveillance à ces différentes étapes de mon parcours. Et enfin, merci pour avoir pris le temps de corriger ce manuscrit.

Docteur Maguette Ndoye,

Je vous remercie d'avoir co-encadré ce travail de mémoire et pour les conseils dans la rédaction de ce manuscrit.

A tout le personnel de la fédération des laboratoires

*Je tiens aussi à adresser mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire de biochimie pour leur accueil, leur esprit d'équipe et en particulier **Père Gora Lo** qui m'a permis de m'intégrer facilement au sein du laboratoire afin de trouver un appui lors des premières semaines.*

A mon Père Gora Lo

Un grand merci, infiniment, pour tous ses conseils, son aide précieuse, sa gentillesse, sa disponibilité, son expertise et la très grande bienveillance dont tu as toujours fait preuve envers moi. Merci de m'avoir fait confiance. Sachez que l'honneur de ce travail vous revient. Il ne suffit, certes pas à apaiser tous les sacrifices consentis à mon égard, puisse-t-il cependant t'apporter réconfort et fierté ; mais aussi le témoignage de ma profonde affection et de mon sincère attachement. Que Dieu nous prête longue vie pour que je puisse vous rendre tout ce que vous avez fait pour moi. C'est un plaisir de travailler à vos côtés.

Bonne fin de carrière.

Liste des figures et des tableaux.

Figure 1: Prévalence de l'hépatite B chronique dans le monde.....	1
Figure 2 : Baruch Samuel Blumberg, Prix Nobel physiologie 1976.....	5
Figure 3 : Différentes formes de particules virales du VHB au microscope électronique.	6
Figure 4 : Particules de Dane (à gauche) et particules subvirales (à droite).	6
Figure 5 : Particule de DANE ou virus complet de l'hépatite B.....	7
Figure 6: Organisation du Génome du virus de l'hépatite B.....	8
Figure 7 : Histoire naturelle de l'évolution de l'hépatite B.....	9
Figure 8 : Cycle de réplication du Virus de l'Hépatite B.....	10
Figure 9 : Evolution des marqueurs biologiques au cours d'une hépatite B aiguë.....	11
Figure 10 : Evolution des marqueurs biologiques au cours d'une hépatite B chronique.	11
Figure 11 : Système COBAS AmpliPrep / TaqMan 48 avec un ordinateur central.....	13
Figure 12 : Vue externe du COBAS AmpliPrep.	14
Figure 13 : Tours de lavages des aiguilles réactifs.....	15
Figure 14 : Plateau pour racks de réactifs et d'échantillons.....	16
Figure 15 : Colonne d'initialisation et lecteur de code-barres.	16
Figure 16: Incubateur de traitement d'échantillons muni d'un rack SPU.....	17
Figure 17 : Plateau de sortie en mode spécifique.	17
Figure 18 : Station de séparation et incubateur de libération de la cible.....	18
Figure 19 : Kit réactifs du test VHB, contrôles témoins et pinces de codes-barres.	19
Figure 20 : Récipients de lavage raccordés aux connecteurs de tubulure de l'AmpliPrep.	19
Figure 21 : Réservoirs de vidange raccordés aux connecteurs de tubulure de l'Appareil.	20
Figure 22 : Unité de traitement d'échantillons (S.P.U).....	21
Figure 23 : Rack d'embouts k.	21
Figure 24: Rack de tubes K.....	21
Figure 25 : K Carrier et le rack de portoir K.	22
Figure 26 : Vue externe de l'Analyseur COBAS Taqman 48.....	22
Figure 27 : Lecteur de code barre à poignée	23
Figure 28: Structure interne d'un thermocycleur de l'analyseur COBAS Taqman 48.....	24
Figure 29 : Tubes de prélèvement sur EDTA centrifugés (en doublon) du même patient.....	25
Figure 30 : Organigramme de la fédération des laboratoires	27
Figure 31 : Extraction de l'ADN viral par les billes magnétiques	30
Figure 32 : Sang total prélevé et centrifugé sur E.D.T.A en doublon.	32
Figure 33 : Tube S, tube K et clips de code-barres d'échantillon et de contrôle.	32

Liste des figures et des tableaux

Figure 34 : Remplissage d'un rack d'échantillons avec un clip de code-barres.	33
Figure 35 : Transfert de plasma anticoagulé du tube EDTA au tube S.....	33
Figure 36 : Rack d'échantillons associé aux tubes S, aux tubes K, aux contrôles et aux clips de code-barres.	34
Figure 37 : Rack de réactifs chargé de Casette CS1.....	34
Figure 38 : Rack de réactifs chargé de cassettes CS2, CS3 et CS4.....	35
Figure 39 : Chargement d'un rack de réactif contenant les cassettes C2, C3 et C4 en position B.	35
Figure 40 : Remplissage d'un rack de SPU.....	36
Figure 41 : rack d'embouts K.....	36
Figure 42 : K carrier associé au Rack de portoir K.	37
Figure 43 : Panneau d'état de la fenêtre System du logiciel AMPLILINK.	38
Figure 44 : Principe d'Amplification par Polymerase chain Reaction en temps réel.	40
Figure 45 : Chargement du portoir k dans un thermocycleur.	41
Figure 46 : Etapes de la polymerase chaine reaction PCR.....	42
Figure 47 : Variation de l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycle	43
Figure 48: Répartition et évolution de la population en fonction de l'âge.....	48
Figure 49 : Répartition de la population d'étude en fonction des trois (3) catégories d'âge. ...	49
Figure 50: Répartition de la population en fonction du sexe.	49
Figure 51 : Répartition de la population en fonction la catégorie de charge virale.	50

Liste des tableaux

Tableau 1 : Interprétation d'un contrôle négatif invalide.....	45
Tableau 2 : Interprétation d'un contrôle positif invalide.....	46
Tableau 3 : Interprétation d'un contrôle positif invalide.....	46
Tableau 4 : Interprétation d'un lot de contrôles valides.....	46
Tableau 5 : Répartition de la charge virale Indétectable en fonction de l'âge et du sexe.	51
Tableau 6 : Répartition de la charge virale Elevée en fonction de l'âge et du sexe.....	52
Tableau 7 : Répartition de la charge virale Très Elevée en fonction de l'âge et du sexe.....	53

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.
ADNccc: Covalently closed circular DNA.
AgHBc : Antigène de Capside de l'Hépatite B.
AgHBe : Antigène de l'Hépatite B.
AgHBs : Antigène de Surface de l'Hépatite B.
ALAT : Alanine Amino Transaminase.
Ac N : Acides Nucléiques.
AN : Analogues Nucléo(s)tidiques.
ARNpg : Acide Ribonucléique Pre-genomique.
ARV : Anti Rétroviral.
ASAT : Aspartate Amino Transaminase.
CHC : Carcinome Hépatocellulaire.
Ct : Critical threshold.
CV: Charge Virale.
DEL: Diode Electroluminescente.
EDTA : Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique.
HPD : Hôpital Principal de Dakar.
HB : Hépatite Virale B.
IgM/IgG : Immunoglobulines M et G.
IFN : Interféron.
IFN-PEG : Interféron Pegylé.
IST : Infections Sexuellement Transmissibles.
OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
PCR : Polymerase Chain Reaction.
PLHB : Programme National de Lutte contre l'Hépatite B.
RE : Réticulum Endoplasmique.
SPU : Unité de traitement d'échantillons.
SQ : Standard de Quantification.
UDIV : Usager de Drogue par Voie Intraveineuse.
VHB : Virus de l'Hépatite B.

Sommaire

Résumé	I
Dédicaces	II
Remerciements	IV
Liste des figures et des tableaux.....	V
Liste des tableaux	VI
Liste des abréviations	VII
Sommaire	VIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉ SUR L'HÉPATITE B	5
I. Généralité sur le virus de l'hépatite B.	5
1. Historique.....	5
2. Structure du virus de l'hépatite B	5
a) Particules subvirales	6
b) Particules virales complètes	7
c) Génome du virus de l'hépatite B.....	7
II. Physiopathologie du VHB.	8
1. Histoire naturelle.....	8
2. Réplication du virus de l'hépatite B.....	10
3. Evolution des marqueurs sérologique	10
4. Rôle de l'antigène HBe	12
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODE	13
I. Présentation du matériel.	13
1. Le COBAS AmpliPrep	13
a) Organisation externe du COBAS AmpliPrep :	14
b) Organisation interne :	15
c) Consommables associés au COBAS AmpliPrep :	18

2. L'Analyseur COBAS Taqman 48.....	22
a) Organisation externe :	22
b) Organisation interne d'un thermocycleur :	24
c) Matériel biologique	24
II. Méthodologie.....	25
1. Cadre d'étude	25
a) Différents services.....	26
b) La Fédération des Laboratoires.....	26
c) Service de Biochimie	27
2. Type et période d'étude.....	28
a) Population de l'étude.....	28
b) Critères d'inclusion	28
c) Critères d'exclusion.....	28
d) Gestion des données.....	28
III. Quantification de la charge virale du VHB.....	29
1. Intérêt de la charge virale.....	29
2. L'extraction de l'ADN viral.....	30
3. Procédure de l'extraction	30
a) Entretien et amorçage du COBAS AmpliPrep.....	31
b) Création des ordres.....	31
c) Préparation du rack d'échantillons.....	32
d) Chargement du rack d'échantillons, des réactifs, des jetables (SPU, tubes K et embouts K), et du K carrier.....	34
e) Chargement des unités de traitement d'échantillons.....	36
f) Chargement des embouts K.....	36
g) Chargement du K carrier ou portoir k.....	37
h) Extraction proprement dite.....	38

4.	Amplification par Polymerase chain Reaction en temps réel.....	40
a)	Procédure de la PCR en réel.....	41
b)	Amplification de la cible.....	41
c)	Amplification sélective.....	42
d)	Détection des produits PCR.....	43
e)	Quantification de l'ADN du VHB.....	43
f)	Analyse et validation des résultats.....	45
5.	Validité d'un lot de contrôles.....	45
6.	Interprétation d'un lot de contrôles valides.....	46
7.	Analyse des données.....	46
	CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	48
I.	Présentation des résultats.....	48
1.	Répartition selon les données sociodémographiques.....	48
2.	Répartition de la population d'étude selon le sexe.....	49
3.	Répartition de la population selon les catégories de charge virale.....	50
4.	Répartition de la Charge virale en fonction de l'âge et sexe.....	51
a)	Cas de la charge virale Indétectable.....	51
b)	Cas de la charge virale Elevée (Elevée ou forte).....	52
c)	Cas de la charge virale Très Elevée.....	52
II.	Discussion des résultats.....	54
1.	Caractéristiques sociodémographiques de la population :.....	54
2.	Population d'étude et Charge virale B.....	55
3.	Variation de la Charge virale en fonction de l'âge et du sexe.....	55
	CONCLUSION.....	56
	Annexes.....	58
	Références bibliographiques :.....	59

Sommaire

INTRODUCTION

L'hépatite B est une infection du foie potentiellement mortelle, causée par le virus de l'hépatite B (VHB). Elle représente un problème de santé publique et peut prendre une forme aiguë ou chronique en exposant les malades à un risque de décès par cirrhose ou par cancer hépatique. Le virus se transmet par contact avec le sang ou d'autres fluides corporels issus d'une personne infectée [1]. Cependant, La présence du VHB dans les divers liquides biologiques des patients infectés tels que le sang, le sperme, les sécrétions vaginales, la salive et le lait maternel, reflète les différents modes de transmission de l'infection :

- la contamination par voie sexuelle survenant lors de rapports non protégés avec une personne porteuse de l'Antigène HBs.
- la contamination horizontale survenant lors d'un contact étroit (lésions cutanées, muqueuses) avec des porteurs chroniques au sein d'une collectivité ou d'un foyer.
- la contamination verticale survenant chez les mères porteuses chroniques, majoritairement en période périnatale (accouchement, maternage) et rarement in utero.
- la contamination par voie parentérale survenant chez les consommateurs de drogues par voie intraveineuse ou pernasale, lors des dons de sang ou des accidents d'exposition au sang [2].

On estime que deux milliards de personnes dans le monde présentent des preuves sérologiques d'infection passée ou actuelle au VHB et 360 millions présentent une infection chronique et courent le risque de souffrir d'une maladie du foie résultant du VHB [3].

En fonction du taux de portage chronique de l'Antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs), On distingue trois situations épidémiologiques :

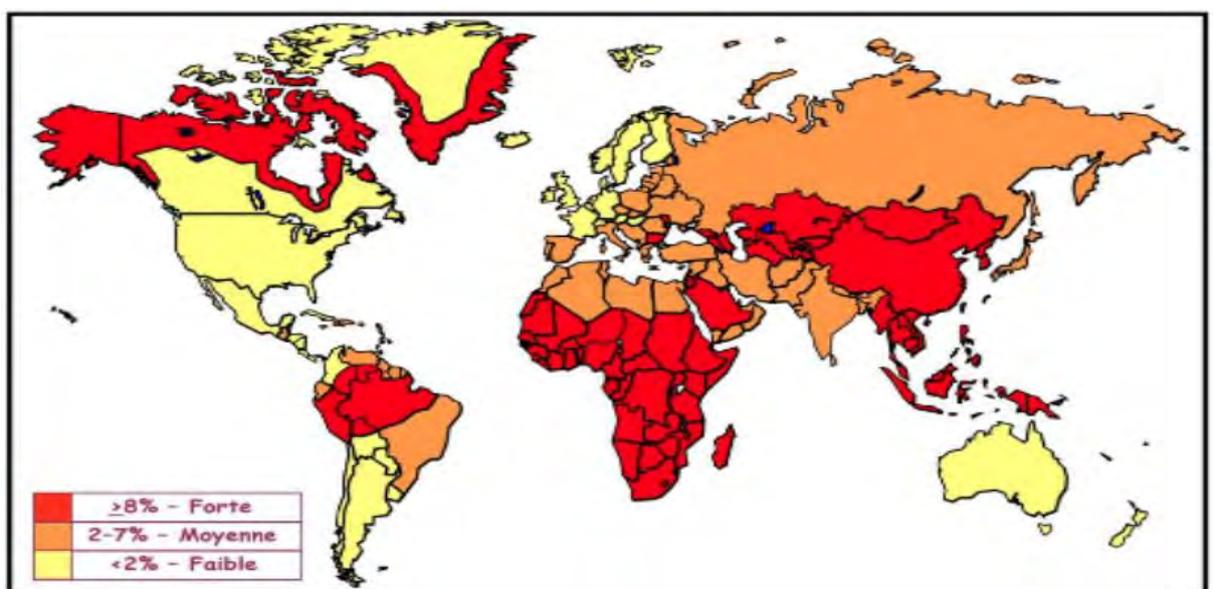


Figure 1: Prévalence de l'hépatite B chronique dans le monde.

- **les zones de forte endémie** où la prévalence de l'AgHBs est supérieure à **8%** avec un risque d'infection par le VHB supérieur à 60%. Ces zones représentent 45% de la population mondiale (Afrique subsaharienne, Asie du Sud-est, Chine méridionale, bassin amazonien). Le plus souvent, il s'agit de transmission mère-enfant ou transmission horizontale intrafamiliale.

- **les zones de moyenne endémie** où la prévalence est comprise entre **2 et 7 %** avec un risque d'infection compris entre 20 et 60%. Ces zones représentent 43% de la population mondiale (les départements français d'Outre-mer, le Proche-Orient, l'Amérique Centrale et du Sud, l'Asie Centrale, le sous-continent indien, certains pays de l'Europe de l'Est et du Sud.

- **les zones de faible endémie** où la prévalence est inférieure à **2%** avec un risque d'infection inférieur à 20%, en particulier en Amérique du Nord, en Europe de l'Ouest et du Nord y compris la France hexagonale et dans le Pacifique; soit 12 % de la population mondiale [4].

Le VHB est à l'origine de 60 à 80% des cancers primitifs du foie dans le monde. En Afrique, la prévalence est estimée à 65 millions de personnes en 2007, soit 56 à 98% de la population. On estime aujourd'hui à près de 400 millions le nombre de porteurs chroniques du VHB et 1,2 millions de morts / an sont attribuées à ce virus, soit 15 à 25% de la population [5], ce qui fait du virus la 10ème cause de mortalité dans le monde et une des trois premières causes de décès en Afrique [6]. Depuis près de 20 ans, le Sénégal est un des pays qui ont réalisé de nombreuses études pour circonscrire l'endémicité de l'hépatite B. Les premières études menées dans les années 90 faisaient état d'une prévalence de 13,8% de portage de l'AgHBs chez des femmes parturientes [7]. De plus faibles taux de prévalences du portage de l'antigène HBs (10,8%) ont été retrouvés chez des militaires sénégalais [8]. Aujourd'hui, le Sénégal est un exemple des pays d'Afrique de l'Ouest qui sont fortement endémiques, avec une prévalence estimée à 11% de porteurs de l'AgHBs. La morbidité et la mortalité liées aux infections chroniques sont très élevées, 25% des porteurs chroniques évoluant vers la cirrhose et le cancer du foie est le premier cancer de l'homme au Sénégal. Dans ce statut, le Sénégal a mis en place en 1999 un Programme National de Lutte contre l'Hépatite B (PLHB). Ses missions ont été élargies aux autres hépatites en 2007. Par la suite, 2 plans nationaux ont été élaborés et mis en œuvre ayant comme objectif la réduction de la morbidité et de la mortalité liées au VHB ainsi qu'une baisse de la prévalence et de l'incidence de cette infection [9].

Le vaccin contre l'hépatite B est la clé de voute de la prévention de la maladie. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande d'administrer ce vaccin à tous les nourrissons, après la naissance, et de préférence dans les premières 24 heures qui suivent. Une série vaccinale complète induit l'apparition d'une concentration d'anticorps chez plus de 95% des nourrissons, des enfants et des jeunes adultes. Cette protection acquise dure au moins 20 ans.

Malgré l'existence du vaccin depuis plus de 30 ans, l'hépatite B reste un problème de santé publique d'ordre mondiale.

Il n'existe pas de traitement spécifique contre l'hépatite B aiguë, et les soins préconisés visent à préserver le confort du malade et l'équilibre nutritionnel, avec une substitution liquidienne en cas de vomissements et de diarrhée [10]. En ce qui concerne l'hépatite B chronique, il n'existe pas de traitement curatif, les traitements disponibles actuellement sont fondés sur l'utilisation d'interféron (IFN) alpha et d'analogues nucléosidiques (AN). Bien que la maladie hépatique soit très bien améliorée par les traitements antiviraux et la réplication virale bien contrôlée, le virus persiste dans les hépatocytes sous une forme transcriptionnellement inactive appelée Covalently closed circular DNA ou « ADNccc », ce qui permet un rebond de la multiplication virale à l'arrêt des traitements [11]. Cependant, Des traitements à long terme sont nécessaires pour éliminer complètement l'ADNccc.

Selon des modèles mathématiques basés sur des données de patients traités à l'adefovir, il faudrait environ 14 ans de traitement pour éliminer définitivement l'ADNccc du foie d'un patient chroniquement infecté par le VHB. Et Malheureusement, une thérapie à longue durée expose les patients au risque de résistance aux traitements. En d'autres termes, ces longues périodes de traitement conduisent à l'émergence de virus mutants résistants aux antiviraux ayant les meilleures capacités répliquatives [12]-[13]. Ces mutants résistants et leur sélection sont responsables des échecs thérapeutiques cliniques [14]. Et dans ce cas, la barrière génétique est théoriquement définie comme le nombre de mutations nécessaires sur le génome pour devenir résistant à une molécule donnée. Cette notion peut être prise en compte mais n'explique pas à elle seule l'émergence du variant d'échappement [15].

La réponse virologique traduite par une diminution ou même par une indétectabilité de la charge virale (CV) du VHB est le reflet direct de l'efficacité du traitement antiviral. Contrairement à la réponse virologique, la définition de la résistance aux antiviraux est basée sur la remontée de la charge virale d'au moins 1 log copies par millilitre par rapport à la charge virale la plus basse sous traitement [16]. Autrement dit, l'apparition d'une résistance antivirale se traduit par une augmentation de la virémie du patient et on décrit un échappement virologique si une virémie préalablement indétectable devient à nouveau détectable [17].

Dans cette optique, il arrive qu'une bonne réponse initiale au traitement (réduction de la charge virale d'au moins 1 Log UI/ml) soit suivie, après quelques semaines, d'une rechute c'est-à-dire une réascension de la charge virale d'au moins 1 Log UI/ ml, révélatrice d'une résistance au traitement [19].

Introduction.

Différentes méthodes de biologie moléculaire permettent la détection et la quantification du génome viral dans les liquides biologiques : les méthodes d'amplification de la cible, comme la « polymerase chain reaction appelée »PCR, et la méthode d'amplification du signal, comme la technique de capture d'hybrides ou celle des ADN branchés. Ces techniques classiques de détection et de quantification du génome viral sont actuellement remplacées par les techniques de PCR dite « en temps réel ». Ces nouvelles techniques de PCR en temps réel n'exposent pas au risque de faux-positifs liés à des contaminations croisées et peuvent être automatisées, ce qui réduit considérablement le temps d'analyse [20].

Cette prise en charge d'une infection chronique inclut de façon parallèle le contrôle de la réplication par les analogues nucléos(t)idiques et la surveillance de l'efficacité du traitement qui se traduit par l'obtention d'une indétectabilité du VHB à l'absence de résistance [18]. De plus, des taux très élevés de la charge virale reflètent souvent une mauvaise prise en charge et un risque d'évolution de la maladie vers la cirrhose. Dans ce contexte, nous avons étudié l'apport de la quantification de la charge virale dans la prise en charge des porteurs chroniques d'hépatite B suivis à l'hôpital principal de Dakar.

Objectif général :

Décrire les différents profils de charge virale chez les porteurs chroniques suivis sous traitement à l'hôpital principal de Dakar.

Objectifs spécifiques :

- _ Définir la relation entre l'âge et la charge virale des patients.
- _ Définir la relation entre le sexe et la charge virale des patients.

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉ SUR L'HÉPATITE B

I. Généralité sur le virus de l'hépatite B.

1. Historique

En 1964, Baruch Samuel BLUMBERG, médecin biochimiste américain travaillant pour le National Institute of Health, s'intéresse à la variabilité antigénique entre les individus au sein des différentes populations. Il émet l'hypothèse selon laquelle des patients ayant reçu un grand nombre de transfusions sanguines doivent développer des anticorps contre les antigènes qu'ils ne possèdent pas. Il met, en présence des échantillons de sang de patients polytransfusés, des sérums de personnes indemnes de toute transfusion. Il observe alors, en immunodiffusion, une ligne de précipitation pour chaque système antigène-anticorps révélé.

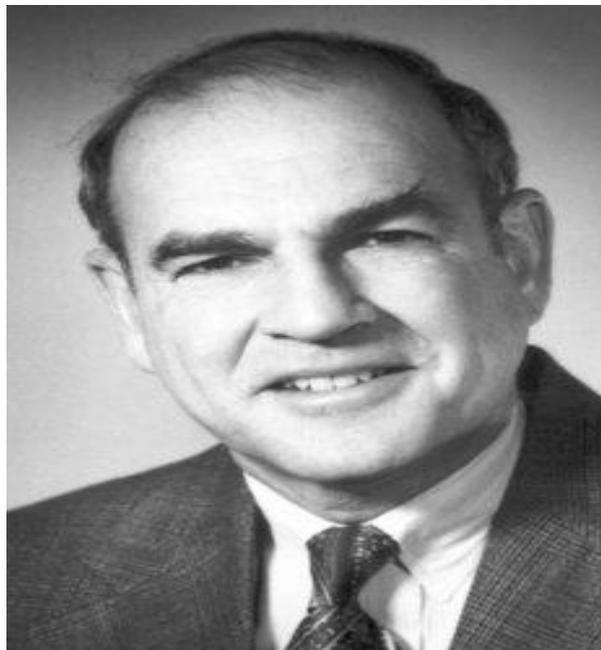


Figure 2 : Baruch Samuel Blumberg, Prix Nobel physiologie 1976.

En 1966, le changement de statut sérologique d'un patient initialement dépourvu d'antigène Australia renforce l'hypothèse d'une infection par un virus et ce patient a présenté une hépatite pendant la période de séroconversion. Ceci conduit à tester de nombreux échantillons de sang de patients aux antécédents d'hépatite. A la fin de l'année 1966, la preuve est faite que le portage de l'Antigène Australia est lié à une hépatite virale. Monsieur BLUMBERG établit alors un protocole de dépistage du sang destiné aux transfusions en éliminant tous les lots porteurs de l'antigène, ce qui entraîne rapidement une nette diminution du nombre d'hépatite [21].

2. Structure du virus de l'hépatite B

L'observation du sérum d'un malade atteint d'hépatite B au microscope électronique révèle la présence de trois (3) types de particules virales morphologiquement différentes : les particules

virales complètes d'un diamètre de 42 nanomètres (nm) connues sous le nom de **particule de Dane**, et les particules subvirales de forme sphérique ou filamenteuse de 20 nm de diamètre.

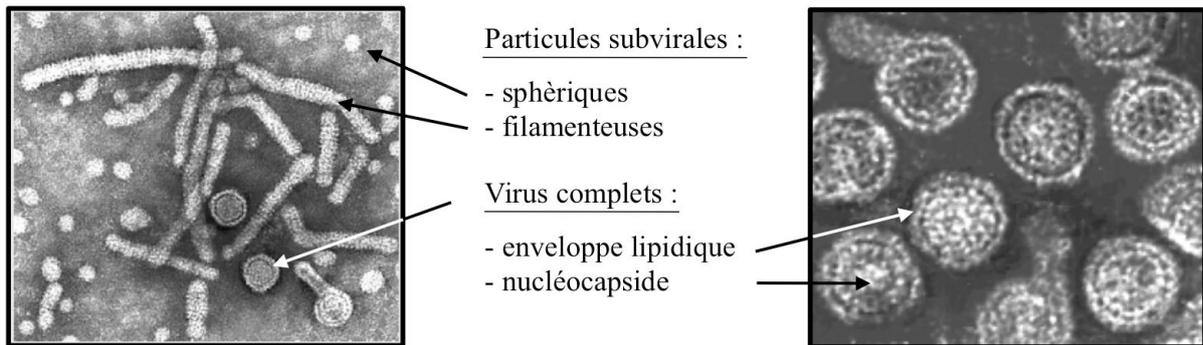


Figure 3 : Différentes formes de particules virales du VHB au microscope électronique.

a) Particules subvirales

Ce sont des enveloppes lipoprotéiques vides d'origine cellulaire qui possèdent des antigènes AgHBs correspondant aux trois glycoprotéines présentes à la surface des particules virales : la petite protéine S (Small), la protéine moyenne M (Medium) et la grande protéine L (Large).

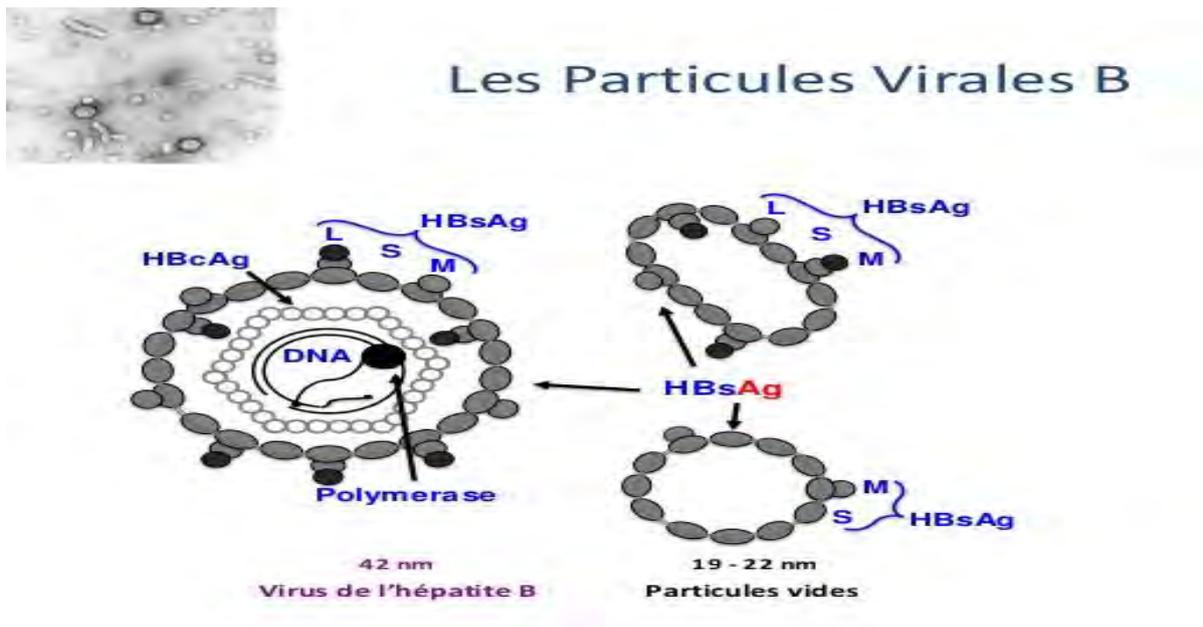


Figure 4 : Particules de Dane (à gauche) et particules subvirales (à droite).

- Les particules sphériques sont composées de protéines S et M, la protéine L n'est présente que dans les virions et les particules subvirales filamenteuses.

- Les particules subvirales (filamenteuses ou sphériques) sont dépourvues de nucléocapside et d'ADN, ce qui ne leur confère aucune capacité d'infection. Il a été suggéré que ces particules pourraient permettre aux virus d'échapper au système immunitaire en saturant les anticorps neutralisants, ou même contribuer aussi à l'installation d'une tolérance immunitaire vis à vis du

VHB aboutissant ainsi au développement d'une infection chronique. Même si ces hypothèses n'ont pas été vérifiées expérimentalement, elles restent plausibles, d'autant plus qu'aucun rôle n'a été attribué aux particules subvirales au cours du cycle viral [6].

b) Particules virales complètes

Le virion complet ou particule de DANE est une particule sphérique avec un diamètre estimé à 42 nanomètre. Il comporte de trois (3) grandes parties :

- une enveloppe lipidique, à la surface de laquelle sont ancrées les protéines virales S, L et M ;
- une nucléocapside centrale constituée de protéines antigéniques portant l'antigène de capsid (AgHBc et AgHBe), et à l'intérieur duquel se trouve le génome du virus ;
- et une polymérase qui possède une activité de transcription inverse et une activité d'ADN-polymérase. L'activité enzymatique ne s'exprime qu'au sein de nouvelles capsides virales [22].

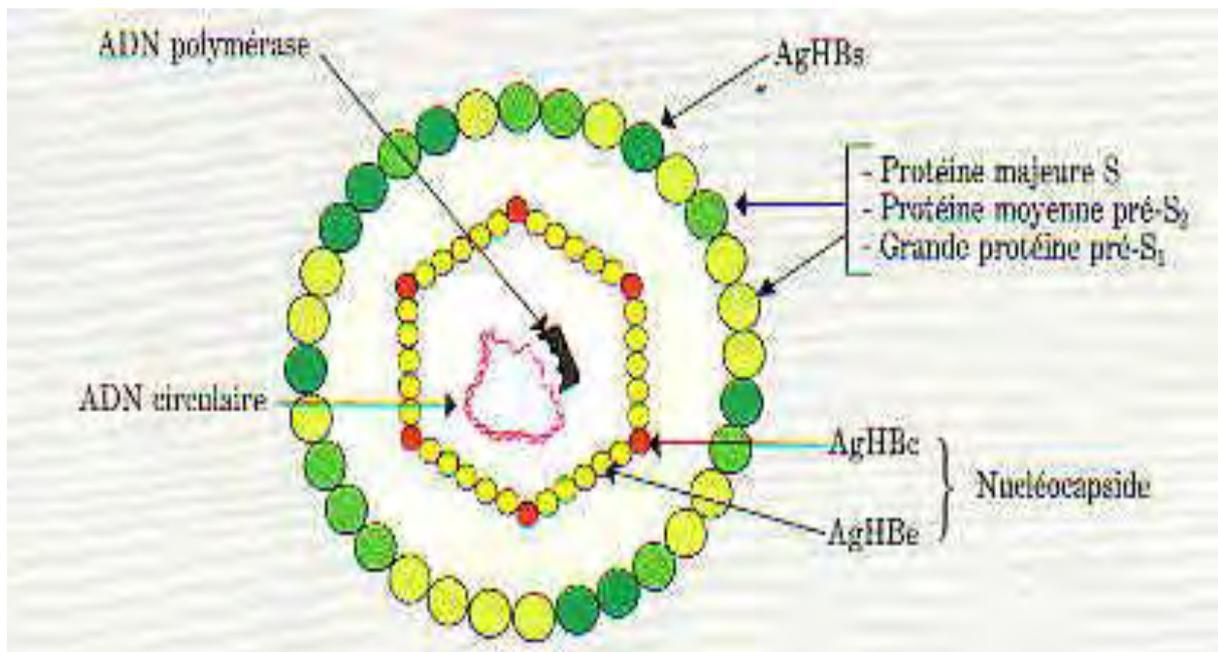


Figure 5 : Particule de DANE ou virus complet de l'hépatite B.

c) Génome du virus de l'hépatite B

Le génome est extrêmement compact et les protéines virales sont codées dans des cadres de lecture partiellement chevauchants [23]. C'est un acide désoxyribonucléique partiellement double brin, et circulaire de 3200 paires de bases. Cette configuration circulaire est maintenue par un appariement des extrémités 5' des deux brins de longueurs différentes : un brin long et complet (brin -) qui contient la totalité du patrimoine génétique du virus et un brin incomplet (brin +) non codant et de taille variable, allant de 50 à 80 % de la longueur du brin long.

Cette structure particulière est liée au mécanisme de répllication spécifique de ce virus. Son organisation génétique est très compacte avec quatre cadres de lecture ouverts: S, C, P, et X :

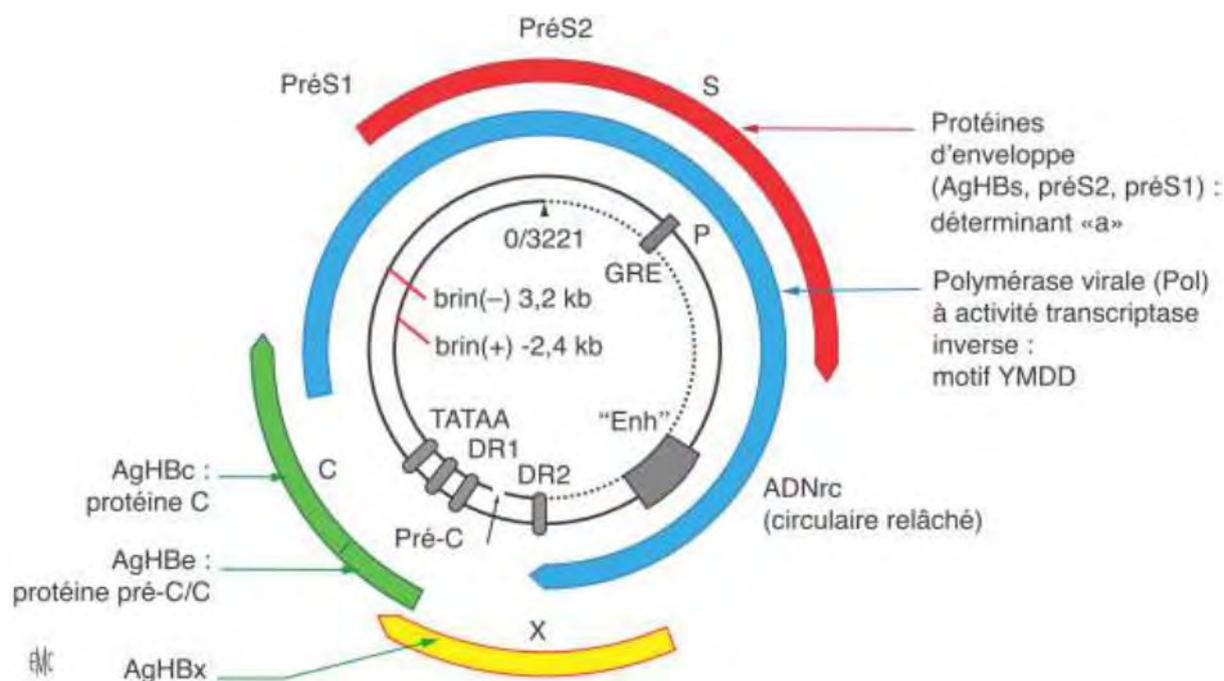


Figure 6: Organisation du Génome du virus de l'hépatite B.

Le chevauchement des gènes et l'utilisation de codons d'initiation transcriptionnels alternatifs permettent la synthèse de protéines virales distinctes :

- _ Le cadre S code pour les protéines d'enveloppe, et est composé du gène S et des régions préS1 et préS2. Le gène S code pour l'antigène de surface AgHBs, et les régions préS1 et préS2 codent pour les AgHBs préS1 et préS2. Ces protéines de surface, largement synthétisées en excès par les hépatocytes infectés, participent à la formation des nouvelles particules virales infectieuses en faible proportion, et la majorité d'entre elles forme des particules vides.
- _ Le cadre C code les protéines "PréCore" ou antigène (AgHBe) et "core" ou antigène (AgHBc).
- _ Le cadre P code la polymérase ou plus précisément l'ADN polymérase de 90 kDa.
- _ Le gène X code pour la protéine X impliquée dans l'initiation et le maintien de la réplication du VHB après l'infection d'hépatocytes [22].

II. Physiopathologie du VHB.

1. Histoire naturelle

Après contact avec le VHB, la période d'incubation varie de trois à quatre mois, mais peut aller de 6 semaines à 6 mois. L'infection initiale est souvent asymptomatique. Dans 10 % des cas, elle est symptomatique et se présente rarement sous forme d'hépatite fulminante gravissime (0,1% à 1% des cas). Après cette phase de primo-infection, l'infection évolue vers la guérison de l'hépatite dans 90 % des cas chez l'adulte avec acquisition d'une immunité protectrice. Dans 10 % des cas, elle évolue vers la chronicité.

Les conséquences éventuelles d'un portage chronique sont une évolution vers la cirrhose du foie, terrain pour le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) [20].

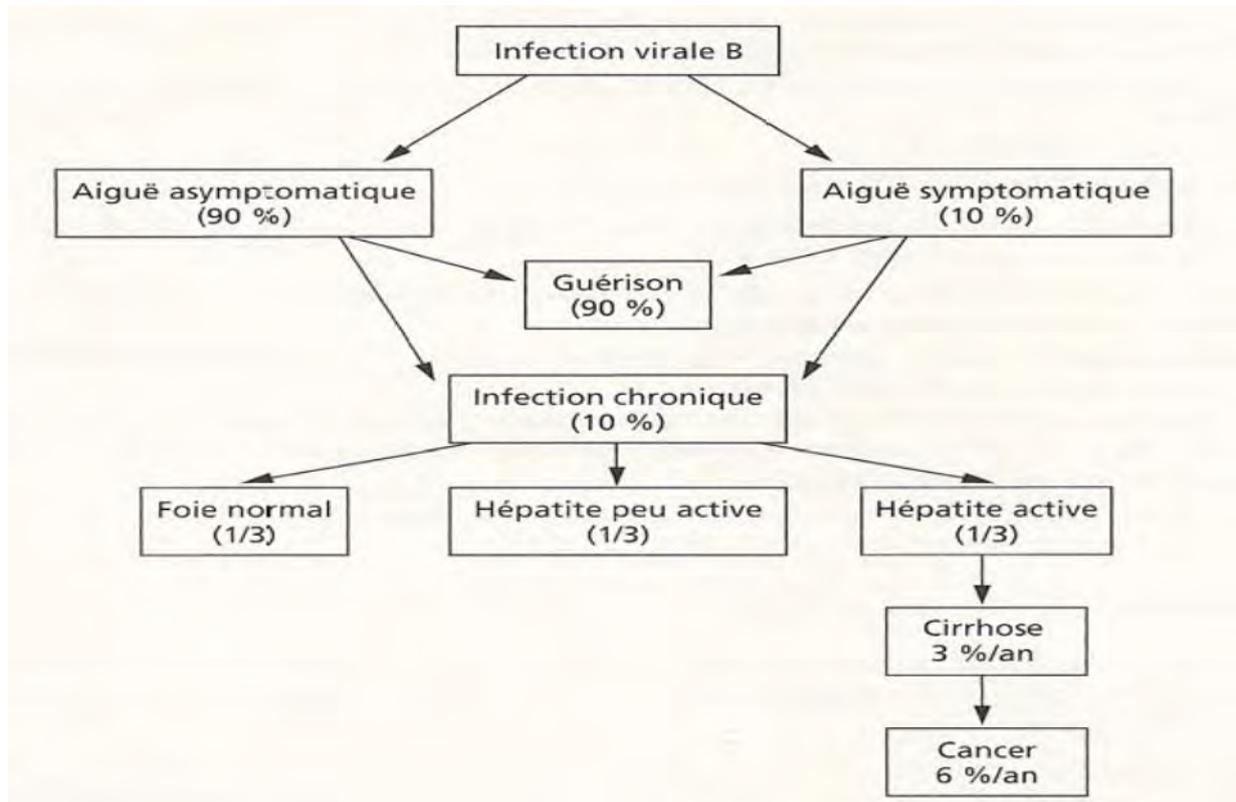


Figure 7 : Histoire naturelle de l'évolution de l'hépatite B

_ **L'infection aiguë** est souvent transitoire et caractérisée par le portage de l'AgHBs pendant une durée inférieure à 6 mois. Bien que la réplication virale soit intense, dans la plupart des cas, mais la mise en place d'une réponse immunitaire forte et spécifique caractérisée par l'apparition des anticorps neutralisants anti-HBs permet une diminution rapide de la charge virale et une résolution de l'infection. Dans 75% des cas, l'infection aiguë passe inaperçue et n'est associée à aucun signe clinique. Dans certains cas, la jaunisse ou des variations des transaminases sériques (ALAT, ASAT) apparaissent lors de l'infection mais ils ne seront que passagers.

_ **L'infection chronique** est définie par la persistance de l'AgHBs pendant une durée supérieure à 6 mois. Les mécanismes impliqués au portage chronique sont multiples et dépendent de l'âge de primo-infection, du système immunitaire et de la souche virale impliquée. Chez plus de 90% des adultes, l'infection se résout par elle-même tandis qu'un portage chronique s'initie chez un faible pourcentage. Il a été montré chez des chimpanzés adultes que la charge virale au moment de l'infection était déterminante dans l'établissement de l'infection chronique. Dans 1% des cas, des infections fulminantes sont caractérisées par une forte atteinte hépatique pouvant mener à la mort : c'est probablement une dérégulation intense de la réponse immunitaire cellulaire qui conduit à une destruction massive des cellules du foie [24].

2. Réplication du virus de l'hépatite B.

Le VHB adhère à la surface des hépatocytes grâce à un récepteur appelé le Sodium taurocholate cotransporting polypeptide, puis pénètre dans la cellule par endocytose. La capside virale libère l'ADN viral dans le noyau de l'hépatocyte. Cet ADN partiellement double brin est réparé dans le noyau et devient super-enroulé : c'est le Covalently closed circular DNA (ADNccc). Il sert de matrice à la transcription. L'ARN pré-génomique de 3,5 kb issu de la transcription est traduit en protéine de capside, en antigène HBe et en polymérase dans le cytoplasme. Cet ARN et la polymérase sont englobés dans les capsides nouvellement formées où l'ARN est rétrotranscrit par la polymérase. Les ARN de 2,4 et de 2,1 kb sont traduits en protéines d'enveloppe, et l'ARN de 0,8 kb en protéine HBx. Les capsides sont recyclées au noyau pour amplifier l'ADNccc, ou dirigées vers le réticulum endoplasmique (RE) pour y être enveloppées.

Les virions aussi bien que les particules subvirales sont transportés vers le milieu extracellulaire par les vésicules d'excrétion [11] et [25].

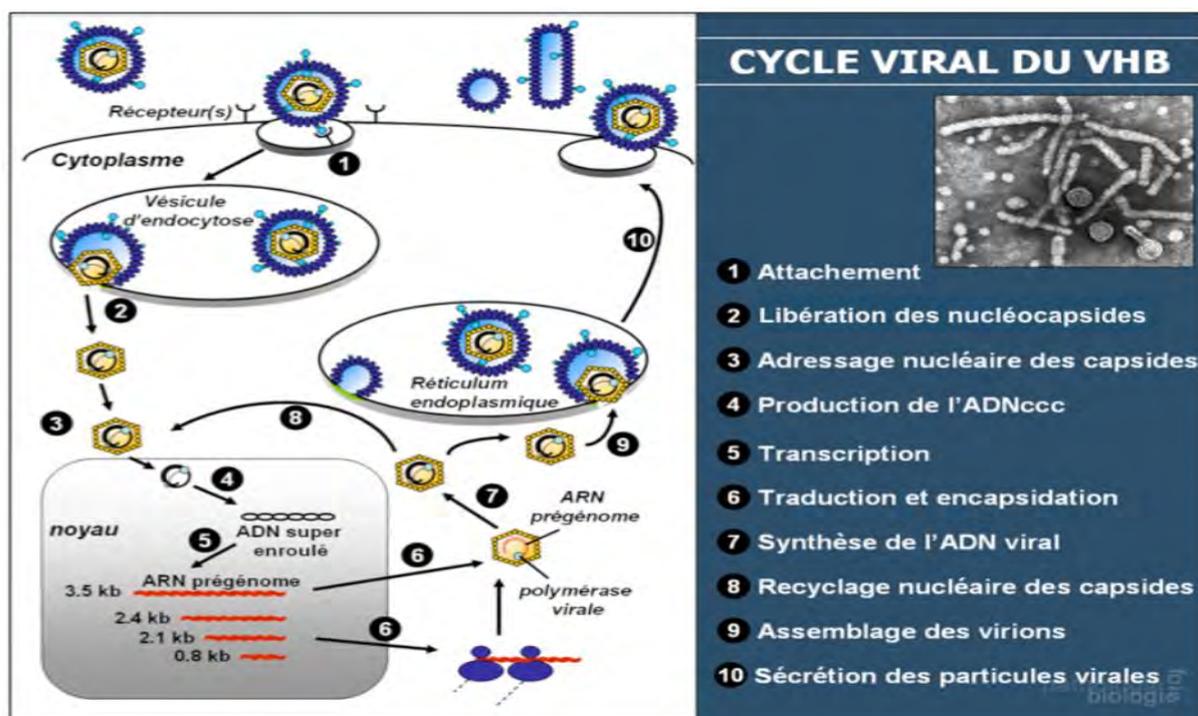


Figure 8 : Cycle de réplication du Virus de l'Hépatite B.

3. Evolution des marqueurs sérologique

Cas d'une Hépatite aiguë : L'AgHBs est le premier marqueur sérologique à apparaître lors de l'incubation, environ 3 semaines avant le début des signes cliniques. Il disparaît 1 à 6 mois après pour laisser place aux anticorps anti-HBs (Ac-HBs), annonçant ainsi la guérison. Les anticorps anti-HBc (Ac-HBc) sont de type IgM et permettent d'affirmer le caractère récent de l'infection. Ils persistent pendant la phase d'infection aiguë et après la guérison, ils sont de type IgG.

L'AgHBe traduit une répllication active, puis disparaît après le début des signes cliniques avec apparition d'anticorps anti-HBe (Ac-HBe). Après la guérison un taux protecteur d'anticorps Ac anti-HBs persiste dans le foie, et une faible répllication persiste pouvant être responsable d'une réactivation virale.

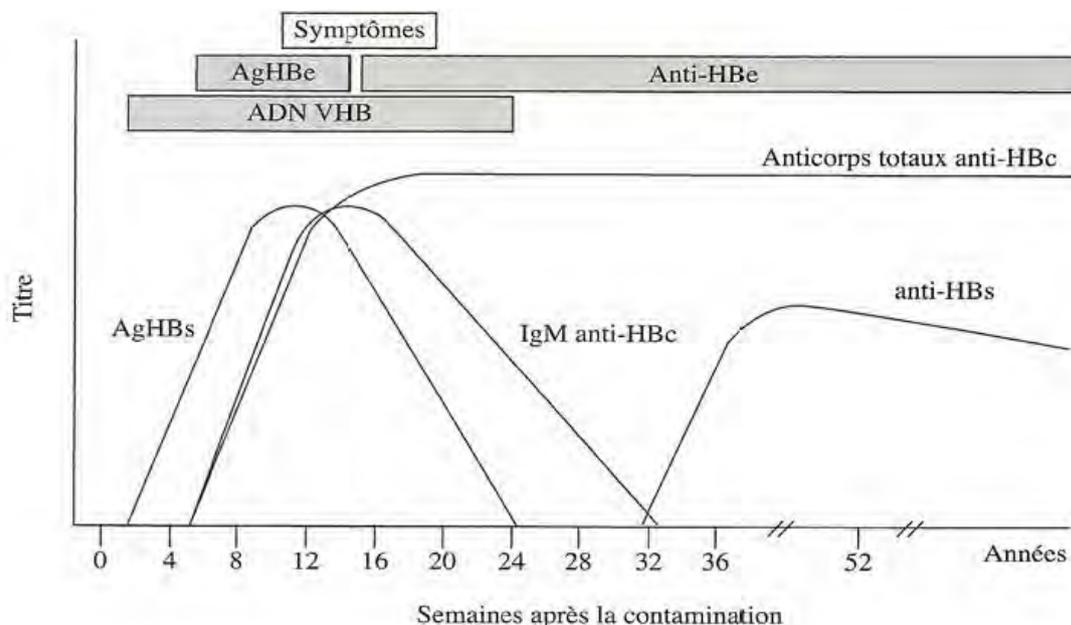


Figure 9 : Evolution des marqueurs biologiques au cours d'une hépatite B aiguë

Cas d'une Hépatite chronique : Elle est caractérisée par la persistance de l'AgHBs à plus de 6 mois associée à la présence des anticorps totaux anti-HBc. La répllication virale est élevée, et l'AgHBe est détectable à l'exception des mutants préC [20].

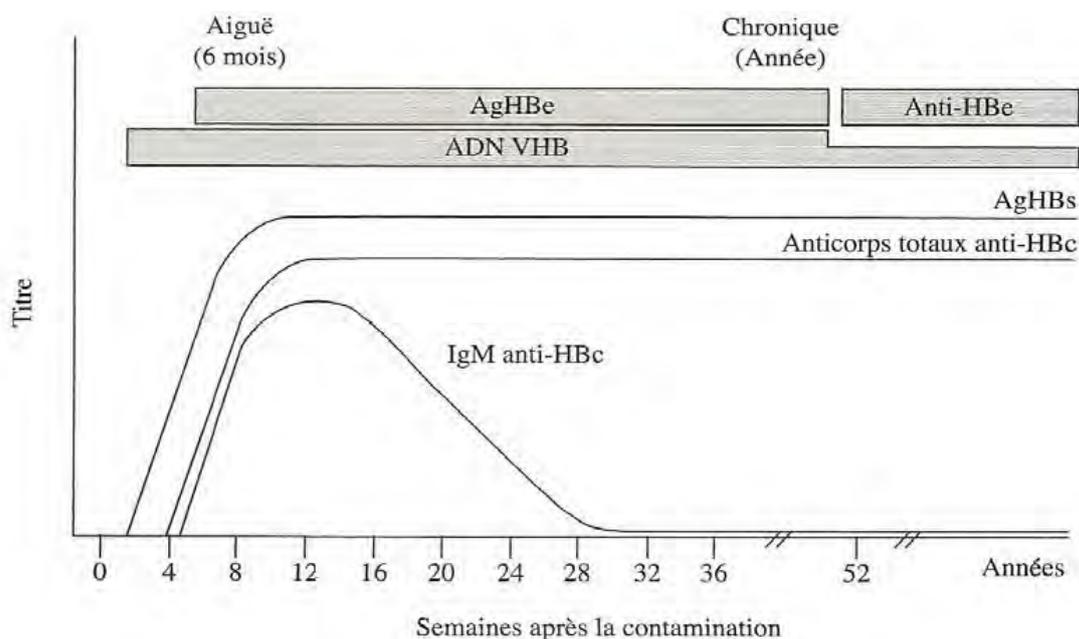


Figure 10 : Evolution des marqueurs biologiques au cours d'une hépatite B chronique.

4. Rôle de l'antigène HBe

L'AgHBe est une protéine détectée dans le sérum des patients infectés par le virus, lorsque celui-ci se multiplie. Cette protéine n'est nécessaire, ni au pouvoir infectieux du virus, ni à sa multiplication puisqu'il existe des virus qui ne peuvent pas la synthétiser. Cependant, il semble qu'elle joue un rôle important dans l'établissement d'une infection persistante, bien qu'aucun argument décisif et expérimental n'ait été apporté à ce jour [26].

Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la protéine PréCore qui comporte au niveau de son extrémité N-terminale un peptide signal qui va l'engager dans la voie de sécrétion avant d'être clivé. La protéine résultante P22 subit ensuite une maturation protéolytique et élimine les 34 derniers acides aminés : cette protéine mature ou antigène HBe est ensuite sécrétée.

De façon surprenante, grâce à un mécanisme encore inconnu, une partie des molécules de P22 est retrouvée dans le cytoplasme. La mise sous traitement est parfois urgente et ne peut se faire sans bilan pré thérapeutique afin évaluer le stade de l'infection hépatique due au VHB. Dans ce contexte, il existe des auteurs qui ont préconisé la quantification de l'AgHBe comme méthode alternative à la quantification de la charge virale dans la prise en charge des hépatites chroniques [27].

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODE

I. Présentation du matériel.

La détection de l'ADN viral par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), constitue la méthode de référence pour un dépistage moléculaire. Plusieurs améliorations et automatisations ont facilité l'utilisation de cette technique à des fins de recherche.

Dans notre étude, la charge virale de 874 échantillons confirmés AgHBs positifs a été quantifiée par la PCR en temps réel, en utilisant la plateforme automatisée de Roche Diagnostics : COBAS AmpliPrep /TaqMan 48, pilotés tous les deux par le logiciel AmpliLink.

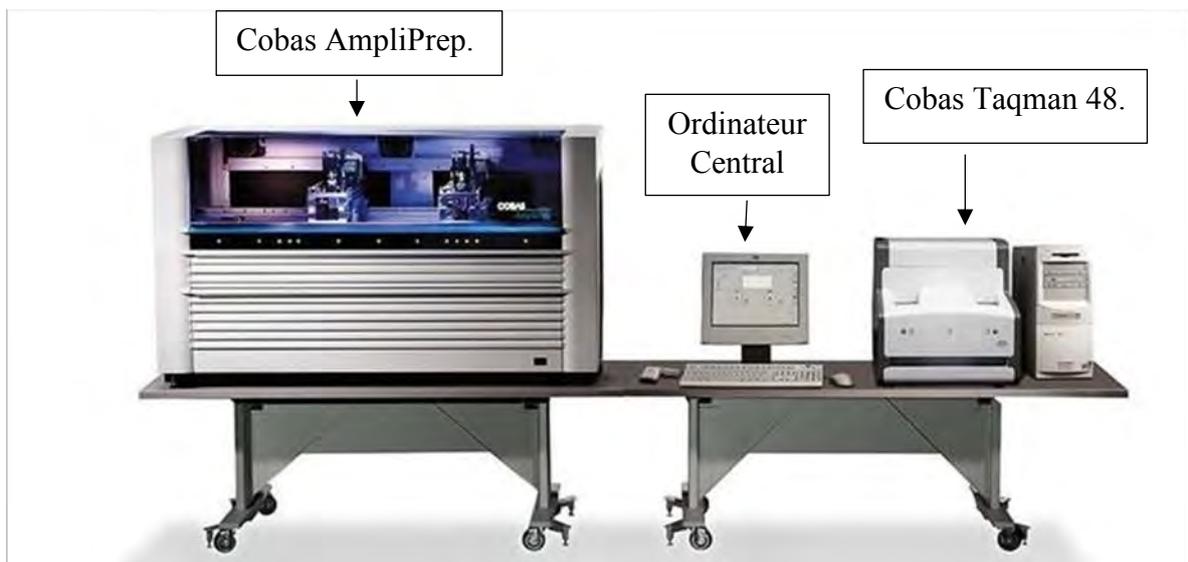


Figure 11 : Système COBAS AmpliPrep / TaqMan 48 avec un ordinateur central.

Le système COBAS AmpliPrep / Taqman est connecté et géré à partir de la station de données du logiciel AMPLILINK via un câble réseau LAN Ethernet. Ce logiciel prend en charge une interface vers un ordinateur central permettant de transmettre les résultats du test [28].

1. Le COBAS AmpliPrep

Le COBAS AmpliPrep permet l'automatisation de la préparation des échantillons (extraction et purification d'ADN ou d'ARN) pour le dosage quantitatif des acides nucléiques grâce à la technologie des billes magnétiques [29].



Figure 12 : Vue externe du COBAS AmpliPrep.

a) Organisation externe du COBAS AmpliPrep :

Le COBAS AmpliPrep est composé de quatre grands compartiments : le couvercle principal, le panneau de chargement, le panneau d'entretien et la barre indicatrice.

_ Le Couvercle principal entoure l'appareil tout en permettant à l'opérateur de visualiser le fonctionnement. Il est verrouillé pendant le fonctionnement de l'appareil.

_ Le panneau de chargement : il permet à l'opérateur d'accéder à l'intérieur de l'appareil pour charger ou décharger les consommables, les réactifs et les échantillons. Il peut être ouvert lors du fonctionnement mais doit rester fermé si aucun rack n'est inséré ou retiré.

_ Le panneau d'entretien dissimule les panneaux d'accès aux composantes électroniques et les tubulures extérieures. Un disjoncteur (situé dans le panneau d'entretien) permet d'accéder à l'interrupteur d'alimentation ON/OFF.

_ La barre indicatrice comporte une DEL d'état et des DEL pour racks avec des codes couleurs donnant une information visuelle. La couleur de la DEL d'état indique l'état de l'appareil :

Noir : l'alimentation coupée, initialisation lancée ou le micrologiciel est incorrect / manquant.

Vert clignotant : le système est en fonctionnement ou subit un entretien ou un diagnostic.

Vert : le système est en mode Standby.

Orange clignotant : l'initialisation est en cours.

Rouge : une erreur fatale s'est produite. Cependant, le système doit être mis hors tension.

La couleur de chaque DEL pour rack indique l'état du rack :

Noir : l'alimentation est coupée ou aucun rack n'est présent sur cette position.

Vert clignotant : un rack est en cours d'insertion sur cette position.

Vert : le rack est chargé, déverrouillé et prêt à être traité.

Orange clignotant : échec de la lecture du code-barres du rack. Cependant, le rack doit être retiré et introduit à nouveau.

Orange : le traitement est terminé ou le rack n'est pas prêt pour le traitement (par exemple il manque des consommables). Cependant, le rack est déverrouillé et peut être retiré.

Rouge : le rack est en cours d'utilisation et verrouillé [28, P A 38 - 39].

b) Organisation interne :

Les principaux composants internes correspondent aux différentes zones de travail de l'appareil COBAS AmpliPrep. Une bonne maîtrise de l'organisation interne s'avère indispensable pour charger les consommables, les réactifs et les échantillons, permettant aussi de bien comprendre son fonctionnement. Ces différents composants et le rôle de chacun sont décrits ci-dessous :

_ **Lampes ultra-violettes** : Deux lampes UV permettent de décontaminer le système entre deux séquences d'analyse. Elles peuvent être allumées automatiquement ou manuellement, et ne sont activées que si le couvercle principal et le panneau de chargement sont fermés.

_ **Filtres à air** : Quatre (4) filtres à air empêchent les particules en suspension dans l'air d'entrer dans le système ou d'en sortir. Trois (3) filtres montés sur le panneau en arrière de l'appareil permettent de filtrer l'air sortant et un (1) filtre supplémentaire monté à l'avant de l'appareil, derrière le panneau d'entretien permet de filtrer l'air entrant dans le système [28, P A 40 - 42].

_ **Tours de lavages des aiguilles** : Deux (2) tours de lavage des aiguilles réactifs permettent le nettoyage des embouts afin de réduire la contamination des réactifs : une tour de lavage (située sur le côté gauche de l'appareil) est utilisée pour l'aiguille du bras de transfert 1, et une tour de lavage (située sur le côté droit) est utilisée pour l'aiguille du bras de transfert 2.

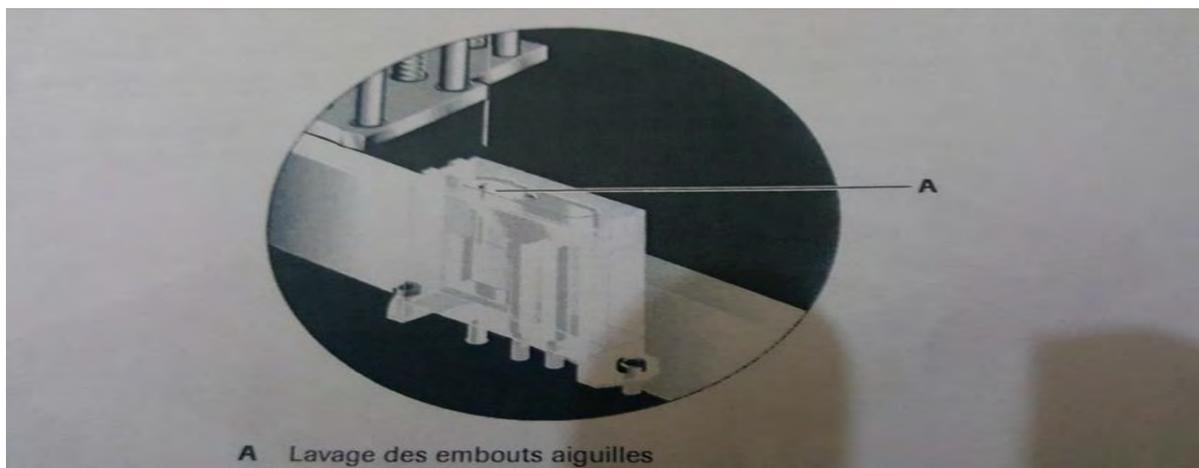


Figure 13 : Tours de lavages des aiguilles réactifs.

Ces aiguilles de réactifs sont automatiquement nettoyées sur une tour de lavage après chaque transfert de réactifs pour éviter toute contamination. [28, Pages A 40 et 43].

_ **Lecteur de code-barres** : il lit automatiquement les étiquettes à code barre du rack de réactifs, d'échantillons, des cassettes de réactifs, et des clips code-barres pour échantillons et contrôles lors du chargement des racks dans l'appareil COBAS AmpliPrep. Les informations relatives aux réactifs et échantillons sont envoyées au logiciel AMPLILINK en vue d'être stockées et d'afficher l'état des réactifs et des échantillons [28, Page A 45].

_ **Incubateurs de traitement des échantillons** : Trois (3) blocs de traitement des échantillons permettent de préparer 72 échantillons en flux continu sans avoir à effectuer de rechargement.

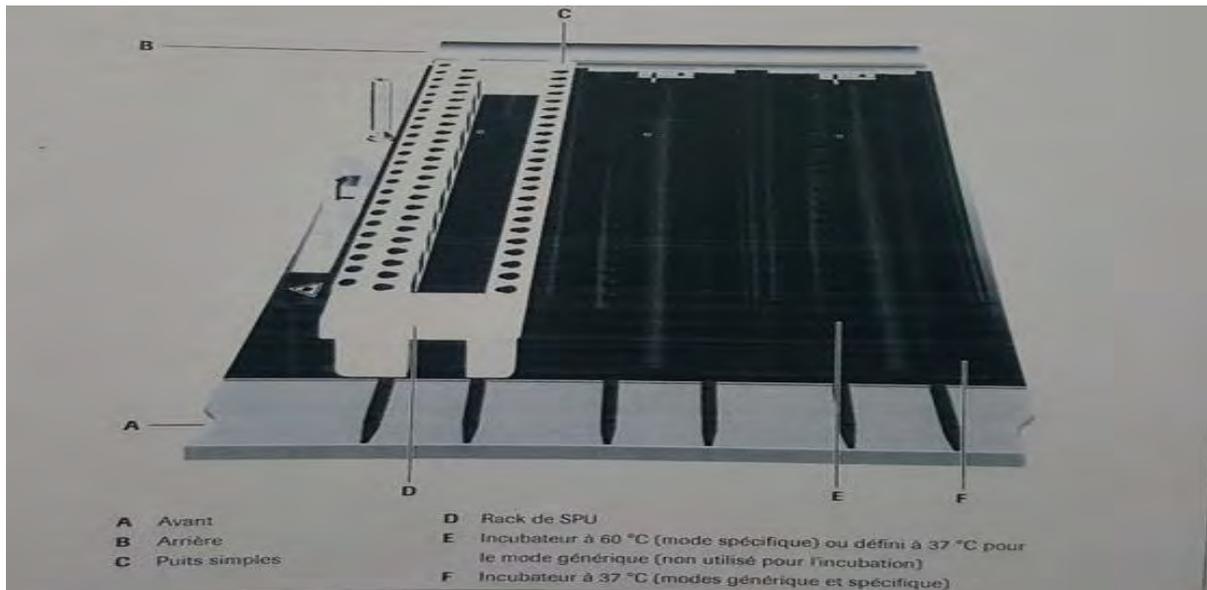


Figure 16: Incubateur de traitement d'échantillons muni d'un rack SPU.

_ **Le plateau de sortie** dispose quatre (4) positions M, N, O et P pour le stockage de tube K, d'embout K, d'un rack de portoir K en mode générique. Ces racks peuvent occuper n'importe quelle position, mais le rack de portoir K occupe (2) positions successives [28, P. A 40 et 58].

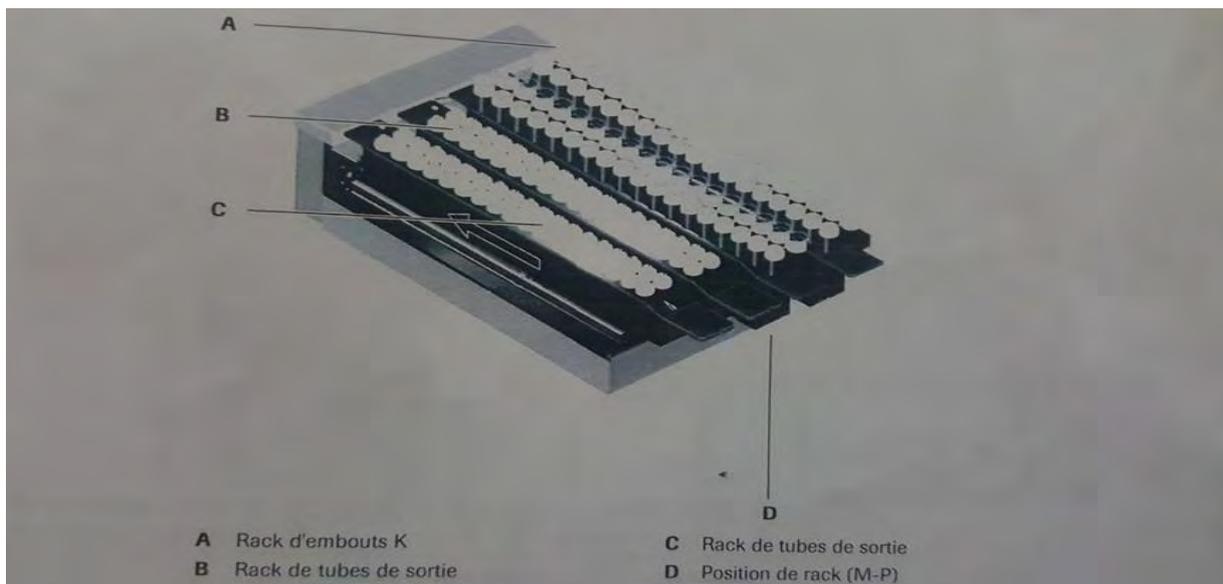


Figure 17 : Plateau de sortie en mode spécifique.

En mode spécifique, le plateau de sortie ne peut stocker que des embouts K et des tubes S.

_ **Station de séparation** : Quatre (4) stations de séparation sont utilisées pour séparer et laver les particules magnétiques. Chaque station de séparation comprend deux (2) puits permettant de recevoir les colonnes de traitement de SPU.

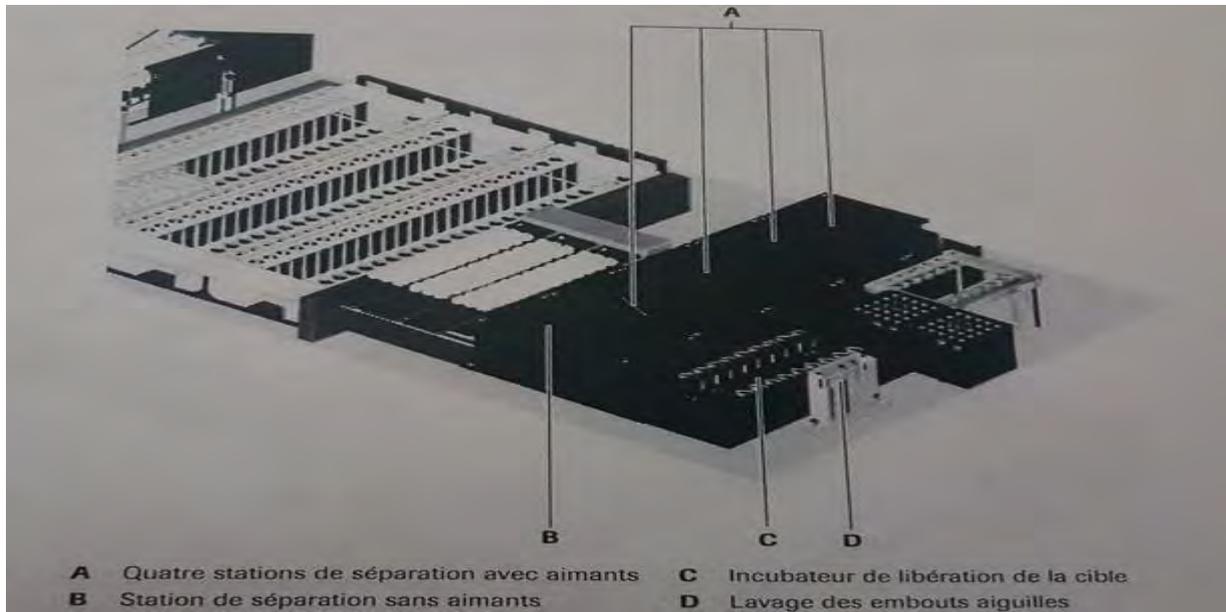


Figure 18 : Station de séparation et incubateur de libération de la cible.

Le puit contenant la colonne de traitement à 37°C possède une roue sur chaque côté munie d'aimants permanents. Une cinquième station permet de refroidir le mélange et d'effectuer un élution avant de pipeter des fractions d'aliquotes dans les tubes K. Elle ne contient pas d'aimant.

_ **Incubateur de libération de la cible** : Il contient un quatrième bloc thermorégulé, maintenu à 80°C, qui permet de libérer les acides nucléiques des particules magnétiques [28, P. A 56].

_ **Positions d'attente de portoirs K** : Deux (2) portoirs K sont mis en attente dans l'appareil, et automatiquement chargés avec les échantillons préparés après l'extraction [28, P.A 40,41].

_ **Bras de transfert** : Deux (2) de transfert sont utilisés pour transférer les tubes S, les tubes K et les SPU, enlever et replacer les bouchons des tubes S et des tubes K, distribuer les réactifs, transférer les échantillons et les mélanges réactionnels. Chaque bras de transfert contient une tête de transfert pouvant se déplacer dans les directions x, y et z. [28, P. A 62].

c) Consommables associés au COBAS AmpliPrep :

_ **Kit de réactifs du test VHB** : Les réactifs du test VHB sont prêts à l'emploi. Ils sont livrés dans des cassettes de réactifs qui possèdent chacune une étiquette de code-barres contenant les informations relatives au réactif, y compris le numéro de lot, la date péremption et le numéro de la cassette. Chaque kit contient quatre (4) cassettes numérotées respectivement CS1, CS2, CS3 et CS 4, et 18 clips de code-barres associés aux trois (3) types de contrôles témoins :

- High Control **HC** (témoin positivement élevée) avec 1 type x 6 Clips de code-barres.
- Low Positive Control **LPC** (témoin positivement faible) avec 1 type x 6 Clips de code-barres.
- Negative Control **NC** (témoin négatif) avec 1 type de control x 6 Clips de code-barres.

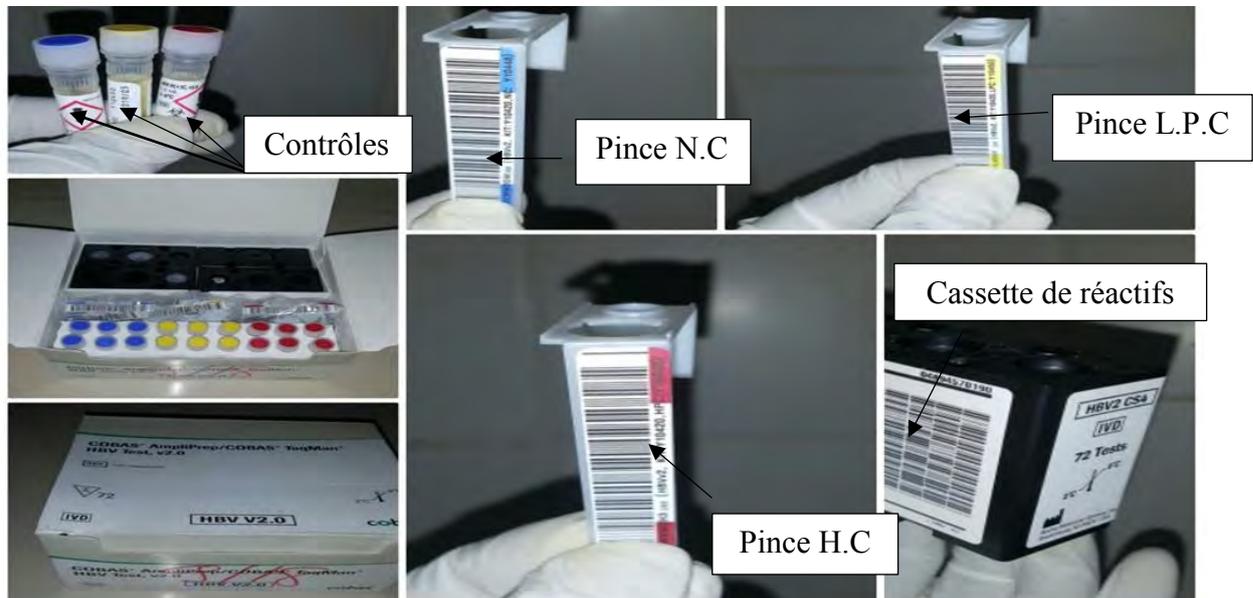


Figure 19 : Kit réactifs du test VHB, contrôles témoins et pinces de codes-barres.

Les clips de codes-barres des contrôles sont codifiés par couleur et encodent le type de contrôle, le dosage et le numéro de lot. Ces cassettes de réactifs doivent être conservées entre 2 et 8 ° C entre les cycles d'analyse et peuvent être utilisées pour un maximum de 64 heures cumulées à bord du COBAS AmpliPrep. Ces réactifs, une fois utilisés, ne sont plus stables que pendant 63 jours au maximum entre 2-8°C ou jusqu'à la date d'expiration. Les contrôles non utilisés sont aussi stables entre 2 et 8 ° C jusqu'à la date d'expiration. Tout contrôle ouvert et inutilisé, doit être jeté. Par contre, les pinces à code-barres peuvent être stockées entre 2 et 30°C.

_ **Réactif de lavage :** L'appareil COBAS AmpliPrep possède deux récipients cubiques de lavage (prêt à l'emploi) assurant un traitement continu des échantillons.



Figure 20 : Récipients de lavage raccordés aux connecteurs de tubulure de l'AmpliPrep.

Chaque flacon contient 5100 ml (5,1L) de solution de lavage, une quantité suffisante pour traiter environ 90 échantillons. Il comporte aussi un détecteur de niveau. Lorsque le récipient, en cours d'utilisation est vide, l'appareil utilise automatiquement l'autre : un message d'avertissement s'affiche et l'icône dans l'onglet **system** de la fenêtre **systems** devient rouge.

L'appareil s'arrête lorsque les 2 récipients contenant le réactif de lavage sont vides. Cependant, il est indispensable de s'assurer que l'un des deux récipients est plein avant de commencer une analyse.

Le réactif de lavage doit être stocké entre 2 et 30 °C afin de garder sa stabilité jusqu'à la date de péremption indiquée. Après ouverture du flacon, il n'est plus stable que pendant 28 jours entre 2-30° C ou jusqu'à la date de péremption selon la première éventualité.

_ **Système de vidange** : Le COBAS Ampliprep possède (2) réservoirs de vidange qui assurent un traitement continu des échantillons et ne peuvent pas être actifs simultanément. Chaque réservoir comporte un détecteur de niveau et peut recevoir les déchets d'environ 150 tests.



Figure 21 : Réservoirs de vidange raccordés aux connecteurs de tubulure de l'Appareil.

Lorsque les déchets dépassent le niveau préfini, un message d'avertissement s'affiche et l'icône de déchets dans l'onglet **system** de la fenêtre **systems** devient rouge. L'appareil ne démarre pas si le réservoir de vidange actif est plein. Cependant, il est indispensable de vérifier si le réservoir de vidange est vide avant de lancer une analyse.

_ **Unité de traitement d'échantillons (S.P.U)** : Toute la préparation des échantillons a lieu dans une unité de traitement d'échantillon ou SPU. Elle contient deux (2) colonnes traitement avec des entonnoirs d'entrée de réactifs, un embout échantillon muni d'un filtre, une colonne d'embout échantillon, un système anti-projection ainsi qu'une colonne de déchets.

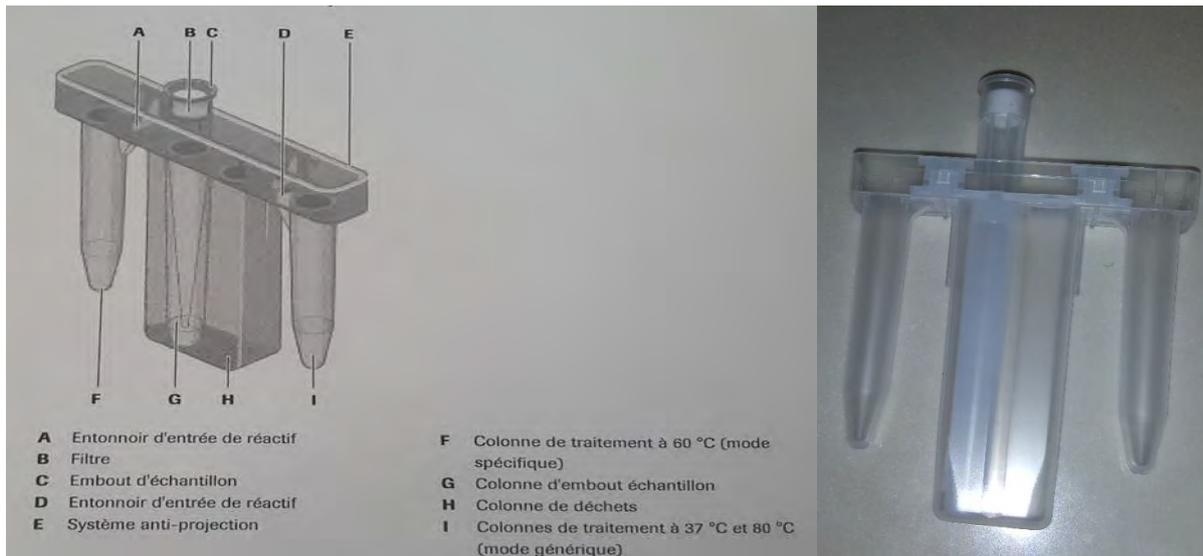


Figure 22 : Unité de traitement d'échantillons (S.P.U)

Les embouts K sont livrés préemballés avec un rack. Ils assurent la mise en suspension et le transfert des échantillons vers les tubes K. Un rack d'embouts K contient 36 unités.



Figure 23 : Rack d'embouts k.

Les tubes K sont aussi livrés préemballés avec un rack. Ils servent à accueillir les échantillons préparés en mode générique. Un rack de tubes K contient 96 unités.

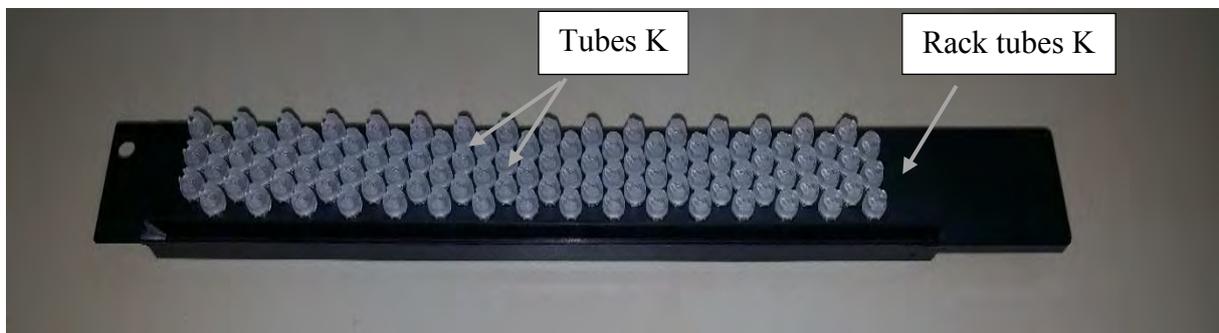


Figure 24: Rack de tubes K.

K Carrier et le rack de portoir K : Un rack de portoir K permet de charger le k carrier dans le COBAS AmpliPrep pour recueillir l'ADN viral purifié puis transféré sur l'analyseur Taqman 48 pour quantifier la charge virale. Chaque K carrier peut accueillir 24 échantillons préparés.

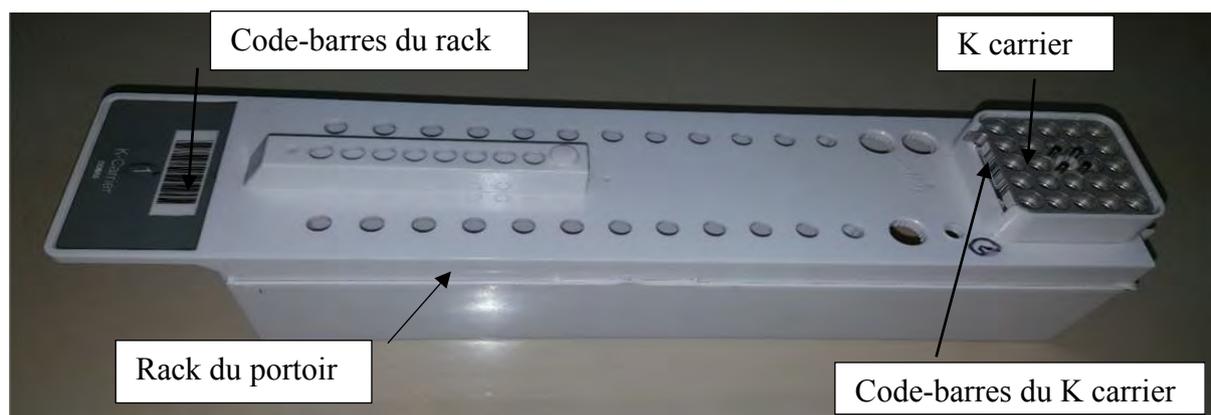


Figure 25 : K Carrier et le rack de portoir K.

2. L'Analyseur COBAS Taqman 48.

Le Taqman 48 est un analyseur de paillasse qui automatise le processus d'amplification et de détection des acides nucléiques préparés par lot en utilisant la technologie basée sur l'activité 5' nucléasique.



Figure 26 : Vue externe de l'Analyseur COBAS Taqman 48.

Il est connecté à la station de données du logiciel AMPLILINK par le biais d'un câble réseau LAN Ethernet. Il est aussi géré à partir de cette même station.

a) Organisation externe :

_ **Le système de thermocycleur** : Il comporte deux (2) thermocycleurs indépendants TCA et TCB. Chaque thermocycleur peut contenir jusqu'à 24 échantillons préparés, permettant ainsi l'amplification et la détection simultanées [28, P. A 30].

_ **Les boutons de commande** : Deux (2) boutons de commande situés sur l'avant de l'analyseur permettent d'ouvrir, ou fermer un thermocycleur et de démarrer une séquence d'analyse. Il est possible d'effectuer ces opérations avec les commandes du logiciel AMPLILINK [28, P. A 28].

_ **Diode Electroluminescente (DEL) :** Le COBAS Taqman 48 contient une DEL d'état et des DEL de thermocycleurs qui possèdent des codes couleurs donnant une information visuelle.

La couleur de la DEL d'état indique l'état de l'analyseur :

- **Sombre ou aucune couleur :** l'appareil est hors tension.
- **Vert clignotant :** l'appareil est actif.
- **Vert :** l'appareil est en attente, prêt à fonctionner.
- **Orange clignotant :** l'initialisation de l'appareil est en cours.
- **Rouge :** erreur fatale ou erreur du système s'est produite. [28, P. A 29].

La couleur des DEL des thermocycleurs indique l'état des thermocycleurs :

Sombre ou aucune couleur : le thermocycleur est hors tension ou en initialisation.

Vert clignotant : l'appareil est actif si la plaque coulissante est fermé ou prêt à fonctionner.

Vert : le thermocycleur est en attente et prêt à être chargé.

Orange clignotant : Il n'y a aucun ordre pour le portoir k chargé dans l'appareil, ou erreur de lecture des codes-barres.

Orange : le thermocycleur a terminé et est aussi prêt à la décharge.

Rouge: emergency (urgence) Stop [28, P. A 30].

_ **Le lecteur de code barre à poignée :** Il est aussi associé à la station de données du logiciel AMPLILINK. Il permet de lire l'étiquette de code-barres du portoir K, du bloc de 24 tubes K, les valeurs de contrôles et de calibration ainsi que l'identification (ID) des échantillons [28, P. A 32].



Figure 27 : Lecteur de code barre à poignée

_ L'interrupteur ON/OFF commande l'alimentation de l'analyseur. Il se situe sur le côté gauche de l'analyseur COBAS Taqman 48. [28, P. A 27].

b) Organisation interne d'un thermocycleur :

Les plaques coulissantes des thermocycleurs sont protégées par des clapets pouvant être fermés ou ouverts manuellement. Ces clapets doivent rester fermés lors de la fermeture de la plaque coulissante.



Figure 28: Structure interne d'un thermocycleur de l'analyseur COBAS Taqman 48.

Si un clapet est ouvert pendant la fermeture de la plaque coulissante, cette dernière s'arrête et un message d'avertissement est généré. [28, P. A 28].

_ **Lecteurs de codes-barres** : Il contient deux (2) émetteurs laser qui permettent de lire les étiquettes de codes-barres du portoirs K lors de leur chargement ou de leur déchargement dans le thermocycleur. [28, P. A 13, 18 et 32].

_ **Système de fluoromètre** : Deux (2) fluoromètres à 24 canaux lisent simultanément tous les tubes K en utilisant quatre (4) combinaisons de filtre différents : une roue à filtre d'excitation et une roue à filtre d'émission actionnées par un moteur pas à pas. La source d'excitation est une lampe tungstène halogène.

Le photodétecteur associé à ces deux fluoromètres est un circuit intégré à application spécifique (Photo ASIC) qui possède une large gamme de signaux dynamique permettant ainsi une lecture simultanée de tous les canaux. [28, P. A 31].

c) Matériel biologique

Il s'agit environ 5 ml de sang total prélevé sur EDTA (Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique) chez les porteurs chroniques de l'hépatite B suivis au niveau des différents services prescripteurs de l'hôpital si le patient est interne. Si le patient est externe, le prélèvement est effectué au niveau du service de la banque de sang sur rendez-vous.

Le prélèvement est en doublon (sur 2 tubes) chez un même patient. Chaque tube comporte une étiquette renseignant le nom, le prénom, la date et lieu de naissance du patient et son numéro d'identification personnel appelé NUIP.

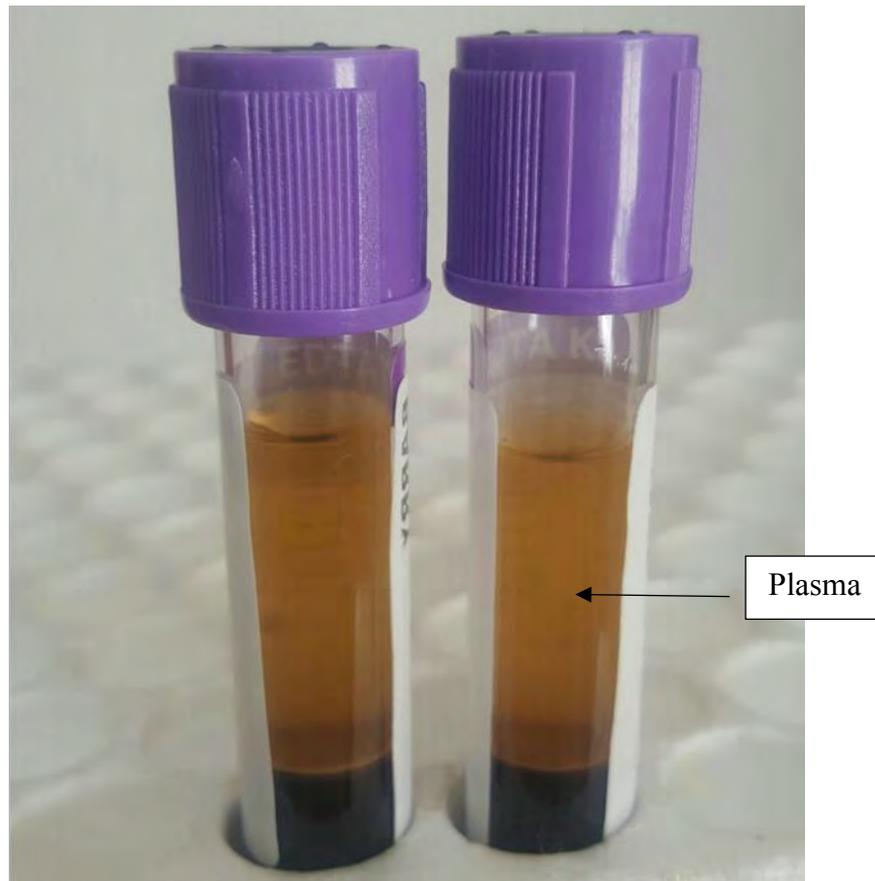


Figure 29 : Tubes de prélèvement sur EDTA centrifugés (en doublon) du même patient.

Chaque service de l'hôpital dispose des agents hospitaliers de santé qui assurent le transport des prélèvements associés aux bulletins d'analyse correspondant jusqu'à la salle de réception du laboratoire. Le technicien en poste est chargé de la réception, de vérifier la conformité des prélèvements (nom et prénom, types d'analyse, service d'origine, interne ou externe...), afin d'attribuer un numéro personnel au prélèvement avant la validation.

Une fois acheminé au laboratoire de biochimie, le sang est immédiatement centrifugé à 3000 tours / minute pendant 5 minutes par le technicien en poste et la charge virale est effectuée par série de 24 composée de trois contrôles du kit de réactif et 21 échantillons de prélèvement.

II. Méthodologie

1. Cadre d'étude

Situé à l'avenue Nelson Mandela dans le quartier du Plateau (Dakar/Sénégal), en bordure de l'anse Bernard, l'Hôpital Principal de Dakar est à proximité de l'Hôpital Aristide le Dantec, de l'Etat-major général de l'armée et du building administratif. Le projet de construction remonte à 1862 et les travaux débutèrent en 1880 avec la fermeture de l'hôpital de Gorée soupçonné d'entretenir le risque épidémique suite à la tragique épidémie de fièvre jaune de 1878 qui frappa Gorée, Dakar, Rufisque et Saint-Louis et qui avait fait 750 décès.

Aujourd'hui, l'hôpital principal de Dakar assure, de par sa large gamme de spécialités exercées et un plateau technique performant, l'accueil d'urgences médico-chirurgicales par une prise en charge de qualité dans le respect de la tradition d'hospitalité et de rigueur de son personnel [30].

a) Différents services.

L'Hôpital Principal de Dakar est structuré en plusieurs groupes de services renfermant chacun des départements répartis en services administratifs et techniques. On y distingue :

_ La direction

_ Le département logistique avec le Service du Matériel et des travaux en régie.

_ Le département administratif et financier qui renferme l'administration, le service de gestion Financière, d'hospitalisations et des soins externes.

_ Les services médicaux associé au département de médecine interne et de spécialités Médico-pathologie qui renferme le service de Médecine Interne (Brévier), la médecine du personnel (Résidence), le service d'Hépatogastroentérologie, la cardiologie (Peltier), et l'infectiologie (Boufflers). Le Département de Pédiatrie qui renferme le service de Pédiatrie A et B.

_ Les Services Chirurgicaux regroupe le département Chirurgie Orthopédique-Traumatologie-Neurochirurgie avec la chirurgie orthopédique-traumatologie (Pavillon Bernard LEQUELLEC) et la chirurgie orthopédique (Pv. FUSTEC). Au niveau du département de Chirurgie Viscérale, on distingue le service Sohier et le Pavillon Général Amadou Lamine DIAGNE. Le département d'urologie-Gynécologie Obstétrique referme le service d'urologie Lapalle et de Gynécologie Chirurgicale.

_ Le Service médicotechnique regroupe le département d'Urgences-Anesthésie Réanimation-Hémodialyse avec le service d'accueil des urgences, de réanimation Chirurgicale brûlés et de réanimation Médicale-Hémodialyse. Le département d'imagerie Médicale est associé avec la radiologie conventionnelle et l'unité d'imagerie à résonance magnétique. Le département de pharmacie hospitalière regroupe le service dispensation, de stérilisation et fluides médicaux [31].

b) La Fédération des Laboratoires.

Crée en 2008, la Fédération des laboratoires est constituée de locaux techniques spacieux et fonctionnels, équipés de matériel de haute gamme. Elle est aussi dotée de bureaux, de magasins destinés au stockage des réactifs et produits de manipulation, d'une salle popote, d'une salle de garde, d'une salle de réunion et/ou de conférence et des toilettes internes destinés au personnel.

Outre la salle de réception de prélèvements, la Fédération des Laboratoires renferme divers services : le service de biologie (regroupant les secteurs d'hématologie, de bactériologie et de parasitologie-mycologie) ; le service de biochimie et le service d'anatomo-pathologie.

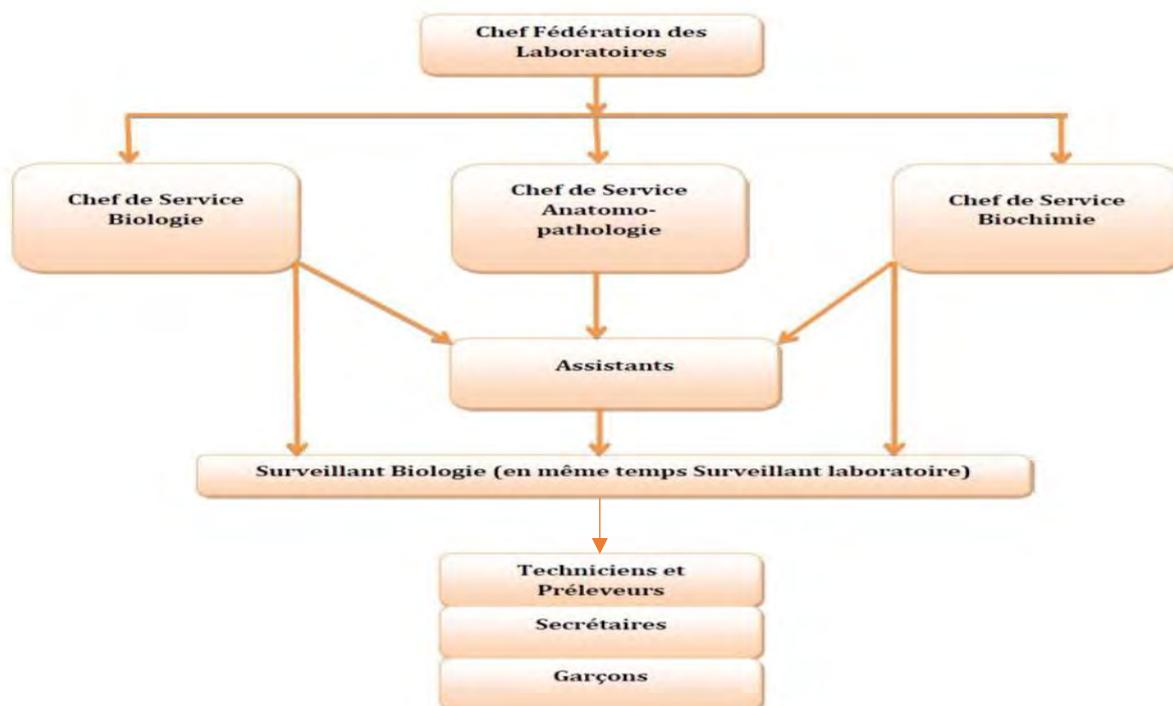


Figure 30 : Organigramme de la fédération des laboratoires

c) Service de Biochimie

Le plateau technique utilisé pour les analyses biochimiques est réparti en trois (3) paillasses sur lesquelles sont regroupés les automates permettant la réalisation des examens de routine d'une manière indépendante :

La Paillasse 1 regroupe :

- le Cobas 6000 destiné aux analyses chimiques et immunologiques des fluides corporels ;
- l'Analyseur Electrolyte 9180 pour le dosage des électrolytes ;
- et le Gazo Optic CCA TS pour la mesure des gaz du sang.

La Paillasse 2 regroupe :

- ARCHITECT CI 4100 utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques du sang, des urines et d'autres liquides pathologiques ;
- le Cobas b221 permet de mesurer les gaz du sang ;
- le Cobas e411 destiné aux immunoanalyses ;
- le Cobas c311 utilisé pour le dosage des éléments contenus dans les fluides corporels ;
- le D10 Bio Rad pour le dosage de l'hémoglobine glyquée ;
- et le Test d'Emmel pour l'identification de la drépanocytose.

La Paillasse 3 regroupe :

- L'appareil HYDRASYS SCAN 2 qui permet réaliser l'électrophorèse de l'hémoglobine, des protéines sériques et le test d'immunofixation.

- la Biochimie urinaire, dosage qualitatif de certains paramètres biochimiques des urines tels que la protéinurie, la glycosurie, la microalbuminurie et la créatinémie, et le COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 pour la quantification de la charge virale des tests VHB ou HIV de type 1.

Le service de biochimie dispose de techniciens supérieurs formés aux techniques de laboratoire qui travaillent en temps plein pour le service de biochimie.

Un technicien en poste est chargé de faire l'électrophorèse de l'hémoglobine et des protéines sériques, le test d'immunofixation si besoin en est, le dosage qualitatif de certains paramètres biochimiques de l'urine et la charge virale en fonction du programme établi par le responsable sous la supervision du major technique. Le service dispose, en permanence, d'une secrétaire médicale qui s'occupe de la saisie des données et du rendu des résultats.

2. Type et période d'étude

Nous avons mené une étude prospective de six (6) mois (Février à Juillet 2018) sur des patients porteurs chroniques du virus de l'hépatite B. Ces patients ont été exclusivement sélectionnés à l'hôpital principal de Dakar au sein du laboratoire de biochimie médicale. Les données ont été complétées également de façon rétrospective en utilisant les archives du laboratoire.

a) Population de l'étude

L'échantillonnage concernait l'ensemble des patients référés au laboratoire pour un test de dépistage du VHB dans le cadre d'un bilan systématique ou pour une confirmation de diagnostic ou pour connaître leur statut sérologique. Durant la période de cette étude, 874 patients ont été dépistés pour l'antigène HBs, et les variables sélectionnées pour vérifier les objectifs de notre étude ont été la charge virale, l'âge et le sexe.

b) Critères d'inclusion

Ont été inclus tous les patients reçus au laboratoire pour un dépistage de l'antigène de surface et qui ont consenti à faire partie de l'étude, de même que les sujets ayant un résultat positif de l'AgHBs parmi les donneurs de sang et ayant accepté de participer volontairement à l'étude en signant la fiche de consentement personnel.

c) Critères d'exclusion

Ont été exclus les sujets perdus de vue après un résultat positif et ceux ayant refusé de participer à l'étude.

d) Gestion des données.

La gestion de données de tous les patients est assurée par un système informatique central appelé **Inlog**. Cette plateforme informatique est un logiciel de gestion de laboratoire d'analyses médicales qui permet, au personnel, d'accéder aux différents services, y compris la saisie des prescriptions, la gestion des prélèvements, la visualisation et l'archivage des résultats.

III. Quantification de la charge virale du VHB

Le test VHB COBAS AmpliPrep / TaqMan 48 est un test d'amplification de l'acide nucléique pour quantifier le nombre de virus de l'hépatite B contenu dans le plasma humain. Il est basé sur deux processus majeurs : la préparation des échantillons pour isoler l'ADN des particules virales et l'amplification de l'ADN par la PCR en temps réel.

Cette réaction de PCR est simultanée à la détection du clivage de la sonde fluorescente (à double marquage) spécifique à la cible.

Le Master Mix assure une quantification équivalente des différents génotypes (A à H) du VHB. Il contient des paires d'amorces et des sondes spécifiques à l'ADN du VHB et au standard de quantification (SQ) : c'est un fragment d'ADN non infectieux qui contient les séquences du VHB, des sites de fixation des amorces identiques à ceux de l'ADN du VHB et une seule zone spécifique à la fixation de la sonde, ce qui permet de distinguer l'amplicon du SQ de l'amplicon du VHB.

La détection de l'ADN amplifié est réalisée en utilisant une cible spécifique et une sonde fluorescente à double marquage spécifique à l'ADN du SQ : Il compense les effets d'inhibition puis contrôle les processus de préparation et d'amplification de l'acide nucléique permettant une quantification plus précise de l'ADN du VHB dans chaque échantillon. La SQ du VHB est ajouté à chaque échantillon avec un nombre de copie connu et est acheminé dans les différentes étapes de ce test de l'extraction à l'amplification.

L'analyseur COBAS TaqMan 48 calcule la concentration d'ADN du VHB dans les échantillons en comparant le signal VHB à celui du Standard de Quantification pour chaque échantillon et contrôle [32].

1. Intérêt de la charge virale

La charge virale, aussi appelée titre viral, est le nombre de copies d'un virus contenu dans un volume de fluide biologique donné (sang, sperme, salive...). Elle peut être exprimée en Unité Internationale (UI) ou en copies / millilitre, ou à l'échelle logarithmique.

Cette mesure de la charge virale est importante au diagnostic, à la prise de décision relative au traitement et au suivi d'un patient souffrant d'hépatite B chronique. Elle définit aussi la réponse virologique au traitement, et permet de guider l'indication du traitement qui repose également sur le taux des transaminases et le degré d'atteinte histologique du foie.

Dans cette optique, il est recommandé de quantifier la charge virale par une méthode de PCR en temps réel sensible qui permet une quantification de l'ADN viral sur une large plage avec un seuil de détection de 20 UI.

2. L'extraction de l'ADN viral

L'appareil COBAS AmpliPrep permet l'automatisation de la préparation des échantillons pour le dosage quantitatif des acides nucléiques. Il automatise l'extraction et la purification de l'ADN du virus grâce à la technologie des billes magnétiques. La procédure traite 500 microlitre (μL) de plasma [29].

Principe :

Les particules virales du VHB sont lysées par incubation à température élevée (60°C) avec une protéase et une solution tampon de lyse chaotrope qui libère des acides nucléiques et protège l'ADN du VHB contre les DNases : la protéase, un nombre connu de molécules d'ADN du SQ et les particules magnétiques sont introduits dans chaque échantillon avec le réactif de lyse.

Par la suite, le mélange est incubé à 37°C . L'ADN du VHB et celui du SQ sont capturés par des particules magnétiques grâce aux ligands (polymères, les verres poreux, les silices ou particules magnétiques inorganiques) présents à la surface de ces particules magnétiques. Les autres substances telles que les sels, les protéines et autres impuretés cellulaires, sont éliminées lors du lavage des particules magnétiques de verre à l'aide d'un aimant

Après fixation des billes et achèvement des étapes de lavage, les acides nucléiques adsorbés sont élués avec une solution aqueuse. L'échantillon traité (contenant les particules magnétiques de verre ainsi que l'ADN viral et celui du SQ) est associé au master mix dans des tubes k puis transféré à l'analyseur COBAS TaqMan 48 [32,33].



Figure 31 : Extraction de l'ADN viral par les billes magnétiques

3. Procédure de l'extraction

La phase d'extraction de l'ADN du VHB comporte plusieurs étapes : l'entretien et l'amorçage du COBAS AmpliPrep, la création des ordres associé à la préparation du rack d'échantillons, le chargement du rack d'échantillons, des réactifs, des jetables (SPU, tubes K et embouts K), du K carrier et en fin l'extraction automatisée proprement dite.

a) Entretien et amorçage du COBAS AmpliPrep

L'interrupteur On Off commande l'alimentation de l'appareil. Lorsqu'il est mis en position On, le COBAS AmpliPrep démarre puis le système procède à l'initialisation en réalisant une série de contrôles diagnostiques et un amorçage. A la fin de l'initialisation, aucun DEL pour rack de la barre indicatrice ne clignote et la DEL d'état (située sur le côté droit de la barre indicatrice) devient verte. L'icône de température, située sous l'onglet **System** de la fenêtre **Systems** du logiciel AmpliLink, reste rouge jusqu'à ce que les divers incubateurs atteignent la température adéquate. Dans ce cas, il est recommandé de laisser les incubateurs atteindre la température adéquate pendant 35 minutes en passant du mode spécifique au mode générique.

Ces procédures de maintenance sont effectuées lors du démarrage du système et se déroulent comme suit :

- Activer la Data Station pour le logiciel AMPLILINK en se connectant d'abord au système d'exploitation Windows, ensuite double-cliquez sur l'icône du logiciel AMPLILINK et en fin se connecter au logiciel AMPLILINK en entrant l'identifiant et le mot de passe assignés.
- Vérifier l'état du réactif de lavage à l'aide de l'écran d'état et remplacez-le si nécessaire.
- Accéder aux onglets **Service Due** de l'appareil COBAS AmpliPrep dans la fenêtre **Systems** du logiciel AMPLILINK afin d'afficher les instructions relatives à l'entretien puis enregistrer les procédures d'entretien lors de leur réalisation.
- Effectuer les tâches de maintenance répertoriées sous l'onglet **Due**. A la fin des procédures de maintenances, l'instrument COBAS AmpliPrep redémarre automatiquement et le système est ainsi prêt à fonctionner.

b) Création des ordres

Une liste de travail est, soit imprimée ou soit établie manuellement, selon l'ordre des demandes de charge virale enregistrées sur la base de données Inlog. Cette même liste est reproduite dans l'interface de travail de l'ordinateur central comme suit :

- A l'aide du logiciel AMPLILINK sous l'onglet **Sample** de la fenêtre **Orders**, des ordres de spécimen pour chaque échantillon et contrôle sont créés par saisie en sélectionnant le type de test approprié (test VHB) puis sauvegardées.
- A la fenêtre **Orders** sous l'onglet **Sample Rack** du logiciel AMPLILINK, une position du rack d'échantillon est attribuée à chaque ordre de spécimen et contrôle. Cependant, le numéro du rack d'échantillons sélectionné doit correspondre à celui du rack préparé.

Par la suite, tous les échantillons qui ont une demande de charge virale sont rassemblés et rangés en doublon sur un portoir selon le même ordre préétabli sur la liste de travail.

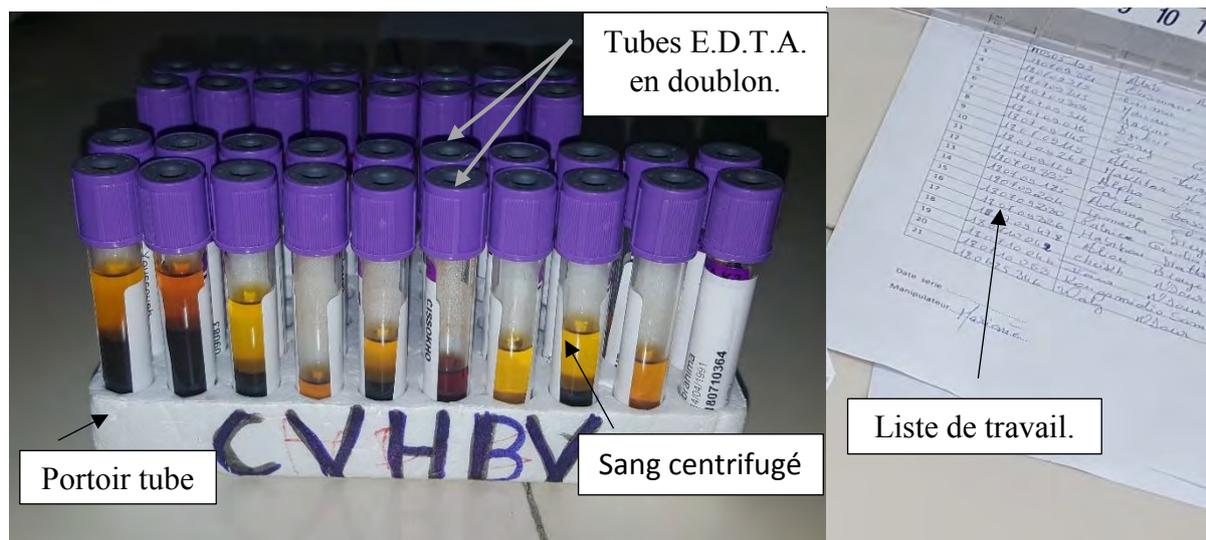


Figure 32 : Sang total prélevé et centrifugé sur E.D.T.A en doublon.

c) Préparation du rack d'échantillons

Le rack d'échantillons étiqueté est muni de code-barres comportant le numéro d'identification du rack. Chacune de ces 24 positions du rack d'échantillons peut accueillir un tube S et un clip de code-barres qui sont nécessaires pour chaque échantillon et contrôle. Un tube K individuel est placé à côté de chaque tube S d'entrée sur le rack d'échantillons.

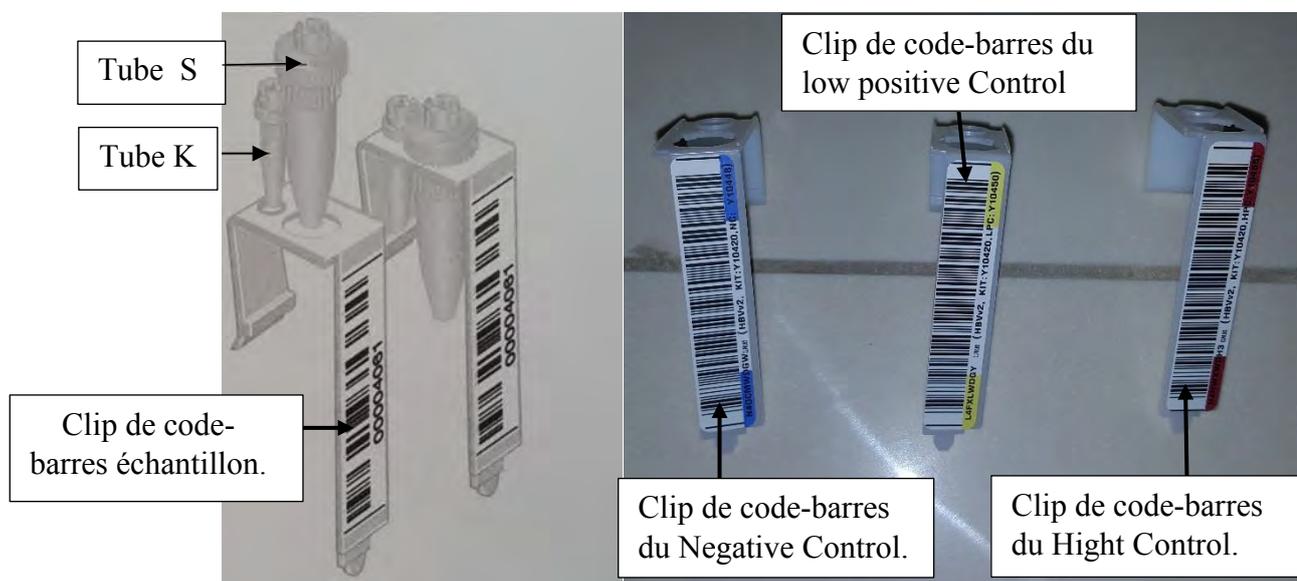


Figure 33 : Tube S, tube K et clips de code-barres d'échantillon et de contrôle.

Grâce à ces clips de code-barres, le logiciel AMPLILINK conserve les informations relatives à l'état des échantillons et contrôles. Ces clips de codes-barres pour les contrôles doivent avoir un numéro de lot identique à celui des flacons de contrôle du kit de réactif. Au cas contraire, il sera impossible d'ordonner plusieurs tests sur un même rack d'échantillons car chaque test doit correspondre à un rack d'échantillons unique.

La préparation du rack d'échantillons se déroule comme suit:

- Fixer un clip de code-barres, un tube S associé à un tube K individuel à partir de la position 4 du rack d'échantillons selon l'ordre préétabli sur la feuille de travail.

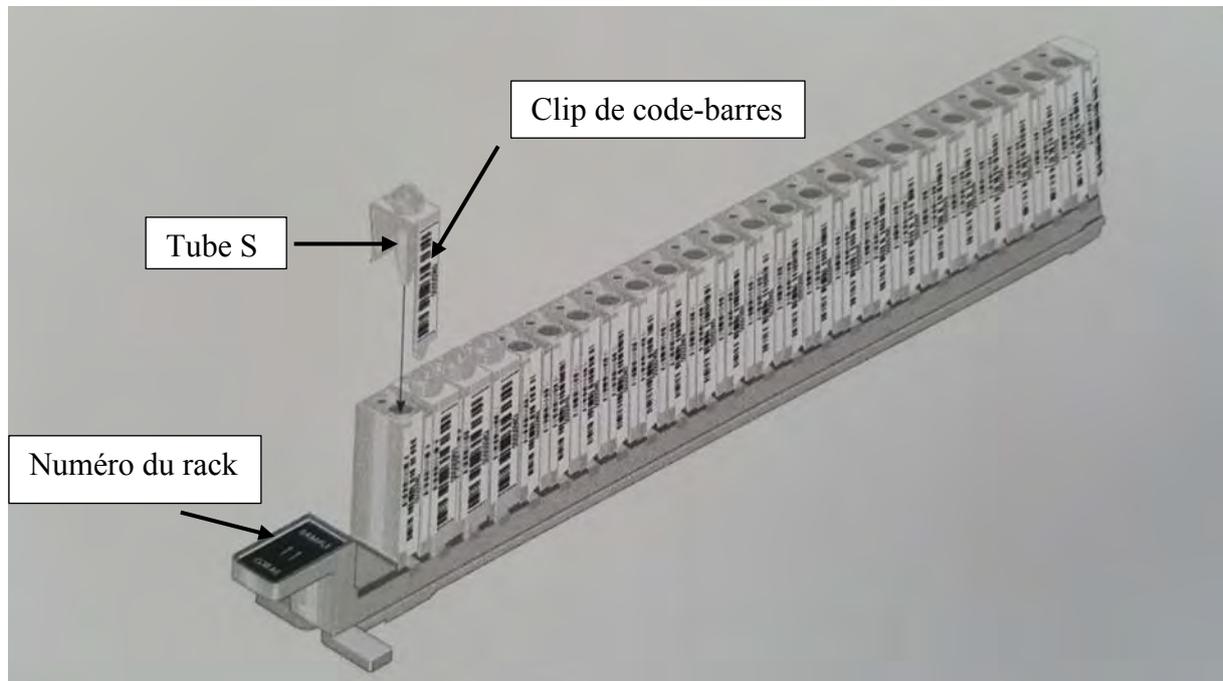


Figure 34 : Remplissage d'un rack d'échantillons avec un clip de code-barres.

- Prélever 1000 microlitres de plasma anticoagulé à l'EDTA de chaque échantillon, en doublon, avec une micropipette à barrière d'aérosol et les mettre dans tube S correspondant à l'échantillon en évitant le transfert de particules de caillots de fibrine.

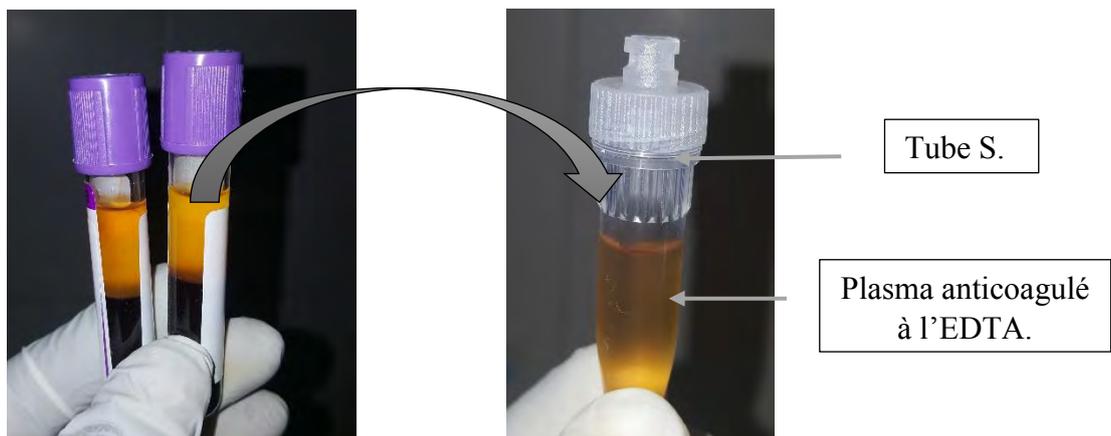


Figure 35 : Transfert de plasma anticoagulé du tube EDTA au tube S.

- Fixer les clips de code-barres spécifiques pour les contrôles associés au tube S au niveau des positions 1, 2 et 3 du rack d'échantillons selon l'ordre respectif NC, LPC et HPC puis transférer le contenu de chaque contrôle dans le tube S correspondant en respectant les positions assignées sur la feuille de travail. Dans ce cas, il est nécessaire de prendre soin d'assigner le bon contrôle à la bonne position avec le clip de code-barres approprié.

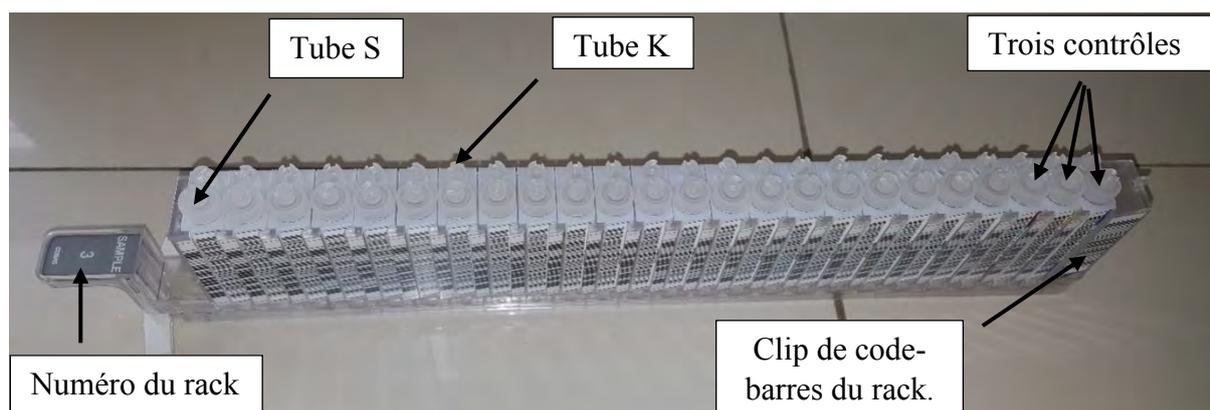


Figure 36 : Rack d'échantillons associé aux tubes S, aux tubes K, aux contrôles et aux clips de code-barres.

- d) Chargement du rack d'échantillons, des réactifs, des jetables (SPU, tubes K et embouts K), et du K carrier.

_ Chargement du rack d'échantillons : L'extrémité du rack d'échantillons préparé est placé à l'avant de l'une des positions de chargement F, G ou H du COBAS. Le rack est ensuite glissé jusqu'au repère. Lorsque la DEL pour rack devient verte, le rack d'échantillons en position de chargement est glissé vers l'arrière de l'appareil.

Un maximum de trois (3) racks d'échantillons peut être chargé dans l'appareil simultanément. Les clips de codes-barres du rack d'échantillons sont scannés lors du chargement, et si un clip de code-barres manque sur une position, le système reconnaît cette position comme étant vide.

_ Chargement des cassettes de réactif : Chaque rack de réactifs peut contenir quatre (4) cassettes de réactifs. Elles sont placées sur le rack en sorte que l'étiquette de code-barres de la cassette soit orientée vers la droite. La cassette HBV CS1 (à particules magnétique de verre) est placée sur un rack de réactifs séparément des autres cassettes CS2, CS3 et CS4 du même kit de réactif.

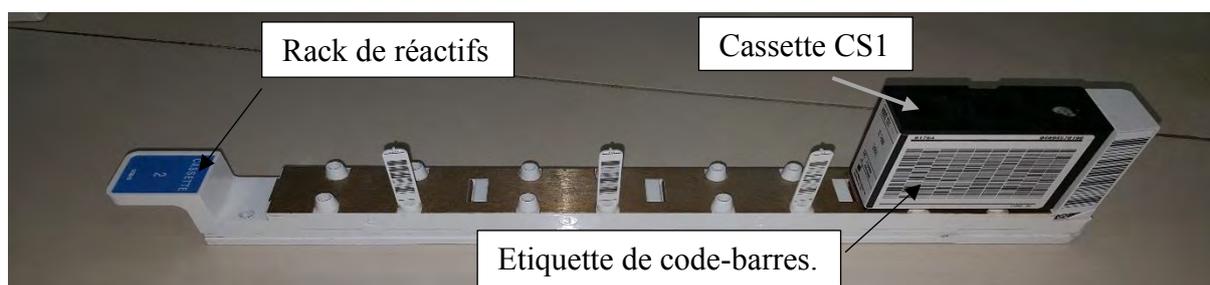


Figure 37 : Rack de réactifs chargé de Cassette CS1.

Ce rack de réactifs contenant la Cassette CS1 (à particules magnétiques de verre) est chargée sur la position A du panneau de chargement du COBAS Ampliprep. Lors du fonctionnement, cette position assure une agitation constante afin de conserver les particules magnétiques de verre en suspension. Pendant l'aspiration du réactif, l'appareil suspend l'agitation afin d'éviter d'endommager l'aiguille réactif.

Les trois (3) cassettes de réactifs CS2, CS3 et CS4 restantes du même kit sont placées sur un autre rack de réactifs.



Figure 38 : Rack de réactifs chargé de cassettes CS2, CS3 et CS4

Le rack contenant les cassettes de réactifs restantes est placé soit dans la position B, C, D ou E du panneau de chargement du COBAS AmpliPrep et néanmoins, être reconnu comme faisant partie du kit. Aucune agitation n'a lieu dans ces positions de racks.



Figure 39 : Chargement d'un rack de réactif contenant les cassettes C2, C3 et C4 en position B.

Les étiquettes de codes-barres des cassettes de réactifs sont scannées lors du chargement. Le logiciel AMPLILINK conserve les informations relatives à l'utilisation de ces cassettes afin d'empêcher le mélange de différents lots de réactifs. Toutes les cassettes de réactifs doivent être retirées du stockage à une température comprise entre 2 et 8°C, et immédiatement chargées sur l'instrument COBAS AmpliPrep. Par contre, lorsqu'elles atteignent la température ambiante à l'extérieur de l'instrument, la condensation peut se former sur les étiquettes de codes à barres.

e) Chargement des unités de traitement d'échantillons

Les unités de traitement d'échantillons (S.P.U) sont retirées de leur emballage, puis placées sur un rack réutilisable. Lors du remplissage de ces racks, les unités de traitement d'échantillons doivent être orientées de telle sorte que l'embout d'échantillons soit tourné vers le côté gauche et les SPU doivent être positionnés de telle sorte que la colonne de traitement à 37° C se trouve dans un puit à droite du rack. Chaque rack peut accueillir 24 SPU et jusqu'à trois (3) peuvent être chargés, comme illustré par la figure ci-dessous.

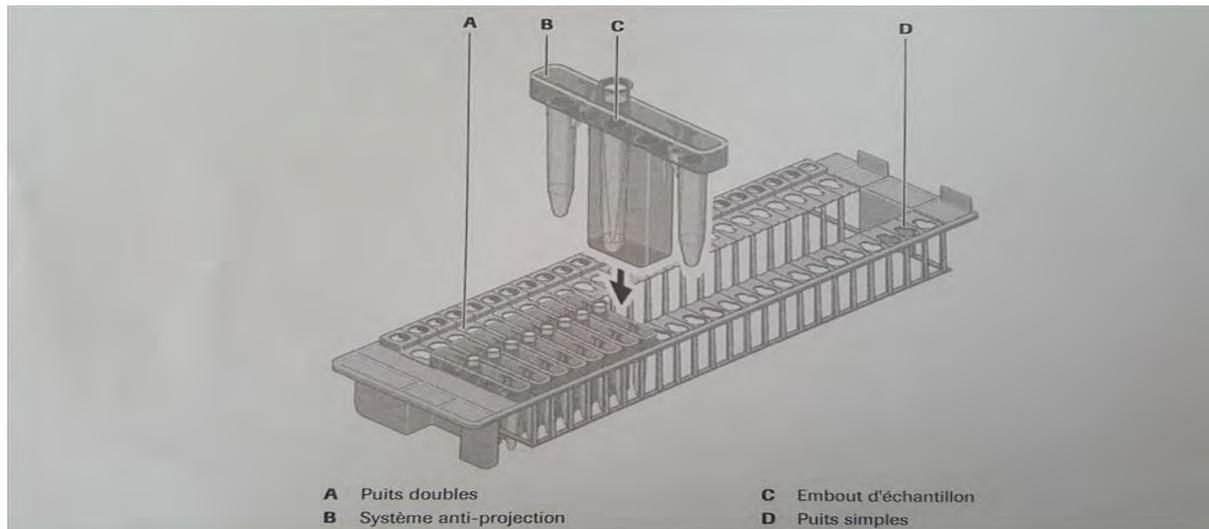


Figure 40 : Remplissage d'un rack de SPU.

Ces racks de SPU sont placés sur les incubateurs de traitement des échantillons de telle sorte que l'extrémité du rack est placée à l'avant de l'une des positions de chargement J, K ou L, puis glisser vers l'arrière de l'appareil. La tête de transfert compte les SPU et met à jour le niveau de remplissage lors du chargement du rack SPU dans le système. Chaque unité de traitement d'échantillon est requise uniquement pour un échantillon ou pour un contrôle.

f) Chargement des embouts K

Les embouts K sont retirés de leur emballage. L'extrémité du rack d'embouts K est placée à l'avant de l'une des positions de chargement M, N ou O, puis glissé vers l'arrière de l'appareil.

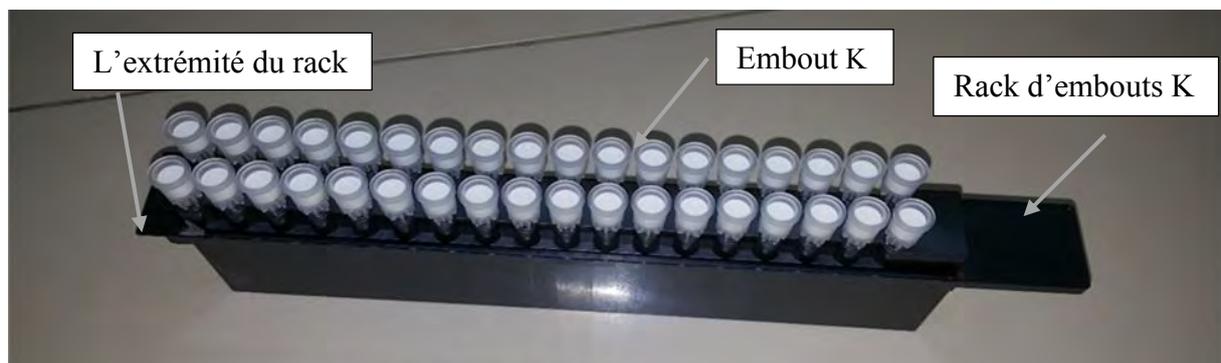


Figure 41 : rack d'embouts K

g) Chargement du K carrier ou portoir k

Le portoir K ou K Carrier est placé sur un rack (voir illustré par la figure ci-dessous). Les codes-barres du rack et du K carrier sont scannés et envoyés au logiciel AMPLILINK avec un lecteur de code-barres à poigné. L'extrémité du rack de portoir K est ensuite placée à l'avant de deux (2) positions successives de chargement M-N ou N-O, puis glissé vers l'arrière de l'appareil.

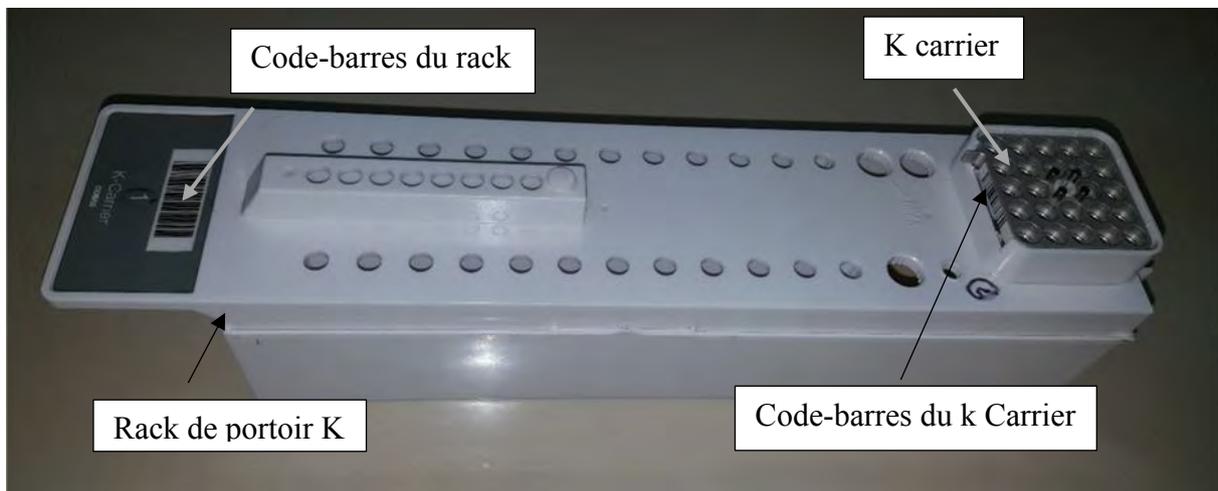


Figure 42 : K carrier associé au Rack de portoir K.

Lorsque le rack de portoir K est chargé, un des bras de transfert du COBAS déplace K carrier vers une position d'attente de portoir K dans l'appareil. Ce même rack peut être retiré et réutilisé pour charger un deuxième portoir K. Cependant, un rack de portoir K doit être inséré, en cas de retrait préalable, pour recevoir le portoir K contenant les tubes K lorsque la préparation des échantillons est terminée.

Sous l'onglet **System** de la fenêtre **Status**, s'affiche un panneau permettant de visualiser l'état du réactif de lavage, du réservoir de vidange, des unités de traitement d'échantillons (SPU), des tubes S, des tubes K, des embouts K et du portoir k préalablement chargés dans l'appareil.

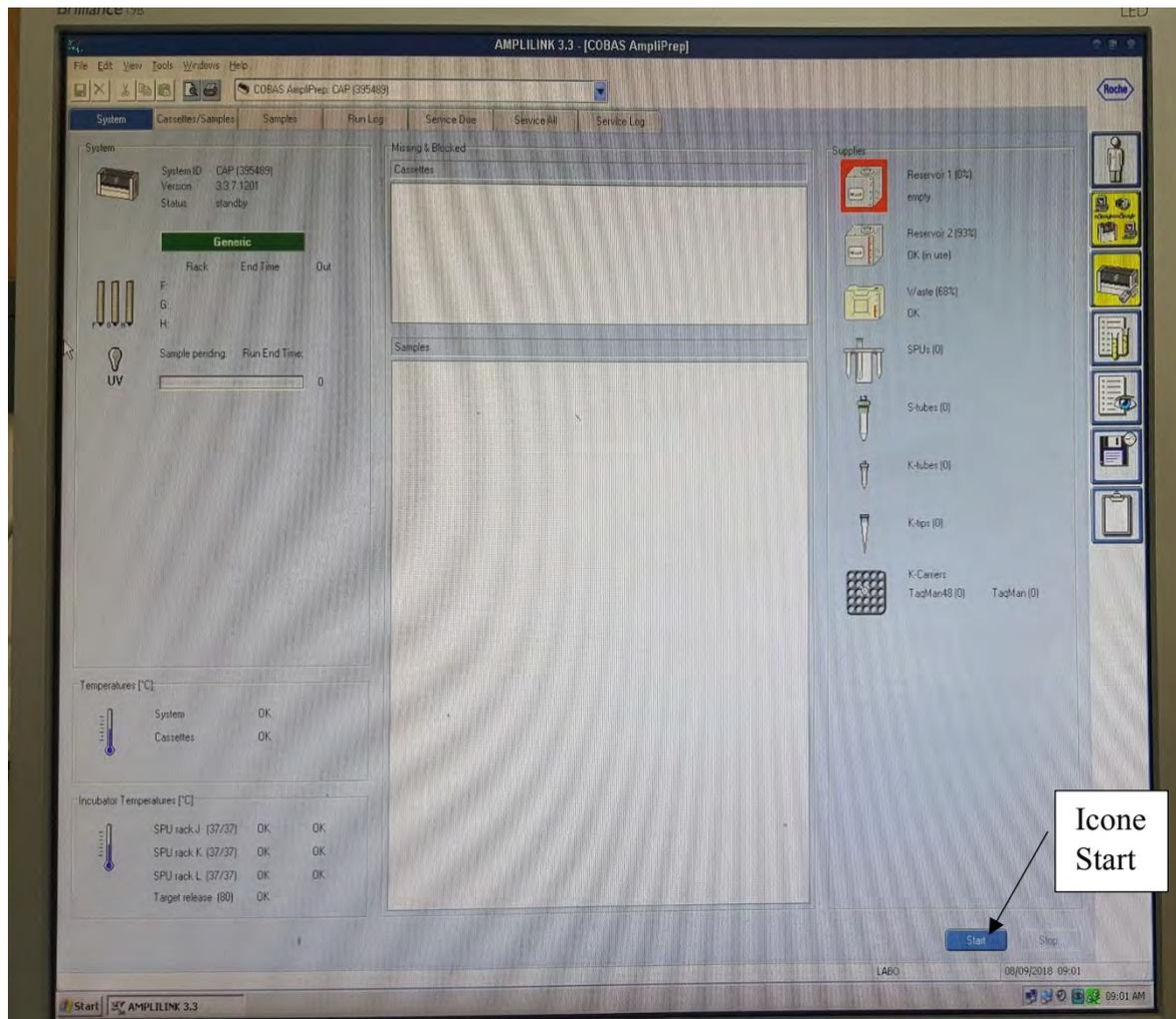


Figure 43 : Panneau d'état de la fenêtre System du logiciel AMPLILINK.

Lorsque ces différents paramètres sont vérifiés et que le rack d'échantillon (associé aux ordres créés) est chargé dans l'appareil COBAS AmpliPrep, de même que les cassettes de réactifs en quantité suffisante, alors la séquence d'analyse est démarrée en cliquant sur l'icône **Start** situé en bas sur le côté droit du panneau System.

h) Extraction proprement dite

La méthodologie générale de préparation des échantillons repose sur deux modes : générique et spécifique. Cependant, il est important de noter que durant notre étude, toutes les extractions de l'ADN viral sont réalisées avec le COBAS AmpliPrep en utilisant le **mode générique** qui s'effectue en quatre étapes à des températures d'incubation différentes :

_ Étape 1 : La lyse et stabilisation de l'échantillon

Les particules virales sont lysées par incubation, à température élevée (60°), avec la protéase et une solution tampon de lyse chaotrope qui libère les acides nucléiques et protège l'ADN du VHB libéré contre les DNases présentes dans le plasma. La Protéase et un nombre connu de molécules d'ADN de SQ sont introduits dans chaque échantillon avec le réactif de lyse.

_ Etape 2 : Capture des acides nucléiques.

Le mélange est ensuite incubé à 37°C, et des particules magnétiques sont introduites dans la colonne de traitement des SPU. Ces particules magnétiques vont capturer l'ADN du VHB et celui du SQ, et les substances non liées aux particules telles que les sels, les protéines et autres impuretés cellulaires, sont éliminées lors du lavage des particules magnétiques de verre.

_ Etape 3 : Purification ou lavage des acides nucléiques

La purification des acides nucléiques capturés par les particules magnétiques de verre se déroule au niveau des stations de séparation et se résume en deux étapes : la fixation et le lavage.

La fixation consiste à immobiliser les particules magnétiques de verre à l'aide d'un aimant : les roues sont tournées de telle sorte que le champ magnétique entraîne les particules magnétiques de verre présentes dans la colonne de traitement à 37°C vers la paroi de la colonne.

Le lavage consiste à aspirer la couche surnageante puis remettre en suspension les particules magnétiques avec le réactif de lavage : après l'ajout de la solution de lavage dans la colonne de traitement, la position des roues change régulièrement de façon à ce que le champ magnétique oblige les particules magnétiques de verre à se déplacer dans la solution de lavage.

_ Etape 4 : Remise en suspension et libération des acides nucléiques capturés

Après fixation des particules et achèvement des étapes de lavage, le SPU est incubé à la station de libération ou incubateur de libération de la cible. Le mélange d'amplification (master mix) est ajouté à l'échantillon traité. Le mélange final est remis en suspension avec les embouts K puis transféré dans les tubes K en position d'attente. A la fin de l'exécution de l'extraction de l'ADN viral, le portoir K contenant les tubes K est retiré, puis transféré à l'analyseur COBAS TaqMan 48 pour l'amplification et la détection.

Cependant, il est important de vérifier les messages d'avertissement via le logiciel AMPLILINK avant le démarrage de l'amplification des acides nucléiques.

Les SPU et les cassettes de réactifs vides sont retirées de l'appareil puis éliminées en respectant la réglementation locale en vigueur. Par contre, les cassettes contenant encore du réactif sont remplacées dans le kit puis stockées entre 2 et 8 °C. Les déchets présentant un risque biologique se trouvent dans les unités de traitements d'échantillons usagés. Tout contact avec cette solution de déchets peut provoquer une infection. Par contre, le réservoir de vidange ne présente aucun de risque car il ne recueille que le liquide provenant du lavage des aiguilles.

Afin de réduire les odeurs, les SPU utilisés sont immédiatement retirés à la fin du traitement puis jetés dans le réservoir de vidange garni d'un sac double. Ces réservoirs qui renferment les SPU usagés doivent être conservés dans une zone ventilée et vidés fréquemment, au moins une fois par jour.

4. Amplification par Polymerase chain Reaction en temps réel.

Principe :

Cette technique consiste à amplifier in vitro un gène cible, spécifique et stable dans le temps. Elle permet de suivre en continu la réaction d'amplification grâce à un signal fluorescent obtenu à partir d'une sonde appelée **sonde TaqMan**. Cette sonde est marquée à l'extrémité 5' par un fluorophore émetteur appelé Reporter, et à l'extrémité 3' par un fluorophore suppresseur appelé Quencher. Lorsque la sonde est intacte, la fluorescence du Reporter est inhibée ou bloquée par la proximité du quencher en raison du transfert d'énergie de type effets Forster.

Au cours de la phase d'hybridation, la sonde se fixe à la séquence complémentaire si le génome viral est présent dans le milieu réactionnel. Lors de l'élongation, l'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase assure le clivage de la sonde en libérant le Reporter de l'influence du quencher. Le fluorophore émetteur, ainsi séparé du quencher, émet un signal proportionnel au nombre de sondes clivées au moment de l'élongation.

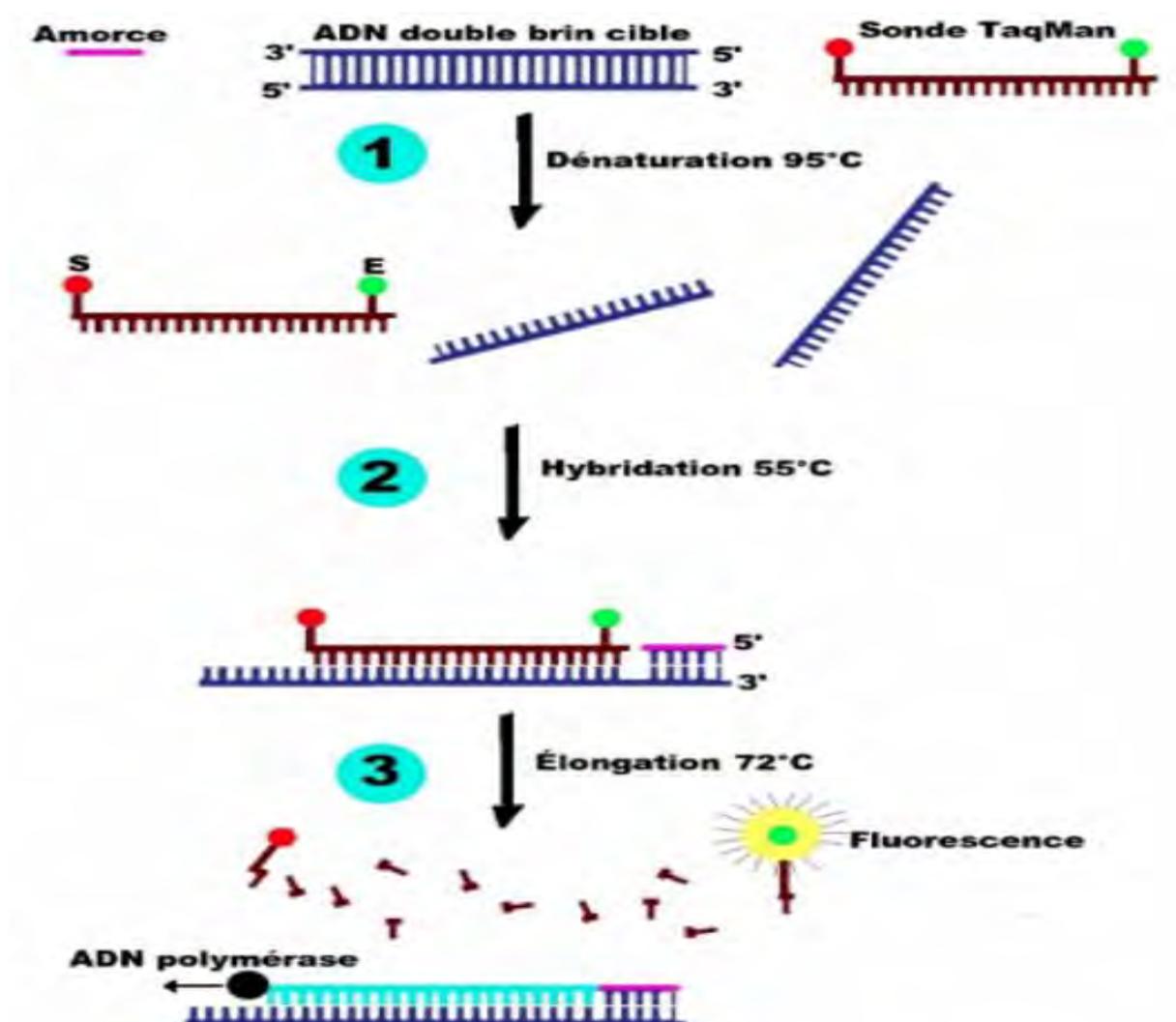


Figure 44 : Principe d'Amplification par Polymerase chain Reaction en temps réel.

Ce phénomène se reproduit à chaque cycle d'amplification et les signaux fluorescents collectés, à chaque cycle de PCR, représentent la quantité d'ADN amplifié à cet instant. Le suivi en temps réel de la fluorescence accumulée permet la quantification de l'ADN viral.

a) Procédure de la PCR en réel

L'étiquette de code barre du portoir K est scannée avec le lecteur de code barre à poignée présent sur la station de donnée du logiciel AMPLILINK. Le K carrier, portant les tubes K dans lesquels la réaction d'amplification par PCR se produit, est chargé dans le thermocycleur à l'aide d'une poignée de manipulation de portoir K afin d'être analysés par le COBAS TaqMan 48.

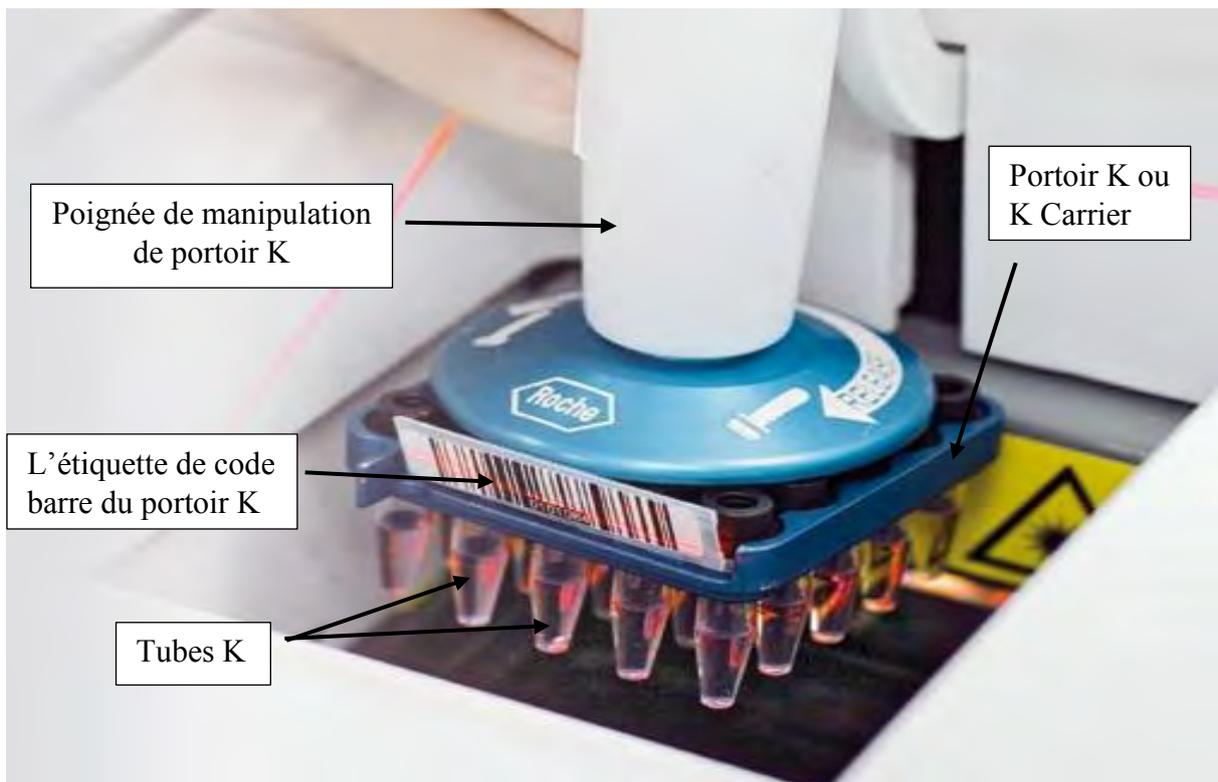


Figure 45 : Chargement du portoir k dans un thermocycleur.

La séquence d'amplification et de détection est démarrée à l'aide du bouton de commande situé sur l'avant de l'analyseur COBAS TaqMan 48. Il est aussi possible d'effectuer cette opération à l'aide des commandes du logiciel AMPLILINK.

b) Amplification de la cible

Le thermocycleur du TaqMan 48 chauffe le mélange final pour rompre les liaisons hydrogènes qui liaient les brins d'ADN ensemble afin de dénaturer l'ADN bicaténaire puis exposer les séquences spécifiques et complémentaires aux amorces : c'est la **dénaturation** de l'ADN de viral.

Au fur et à mesure que le mélange refroidit (55°C), les amorces s'hybrident aux brins d'ADN monocaténaire par complémentarité des bases : cette étape est appelée **hybridation**.

En présence d'ions manganèse (Mn^{+}) et d'un excès de désoxynucléotide triphosphates (dNTPs) tels que l'Adénine-triphosphate, l'Uridine-triphosphate, la Cytosine triphosphate et la Guanine-triphosphate, l'ADN polymérase thermostable *Thermus* specie allonge les amorces hybridées le long des matrices cibles, ce qui génère une molécule d'ADN bicaténaire appelée amplicon. Cette étape de la PCR est appelée **élongation**.

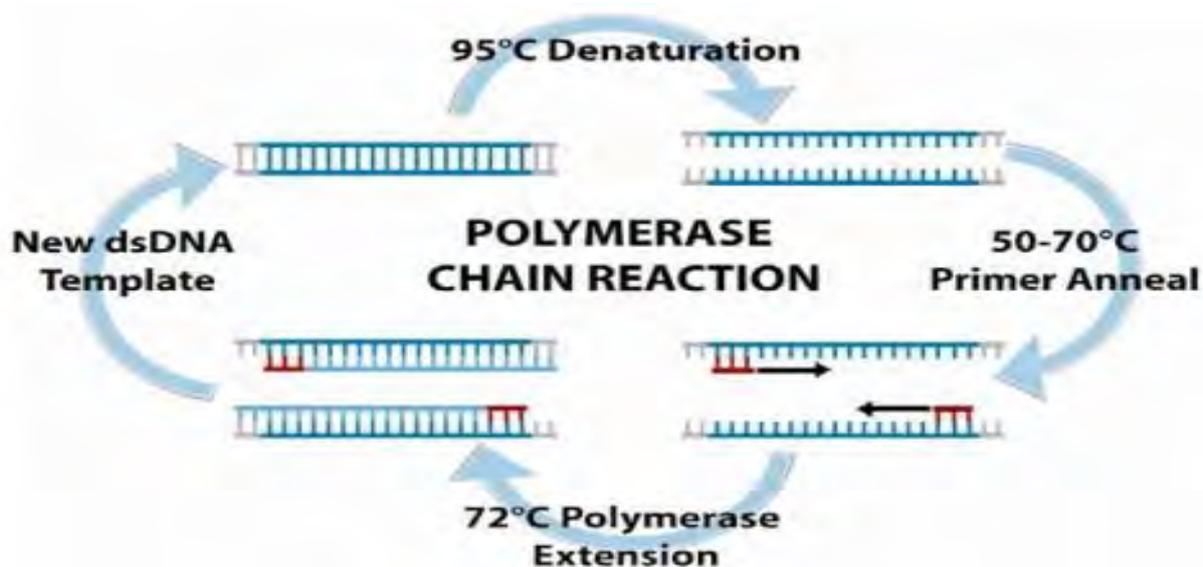


Figure 46 : Etapes de la polymerase chaine reaction PCR

L'analyseur TaqMan répète automatiquement cette opération pour un certain nombre de cycles préprogrammés en doublant à chaque cycle le nombre d'amplicons.

c) Amplification sélective

Dans ce test VHB COBAS AmpliPrep TaqMan 48, l'amplification sélective de l'ADN viral est réalisée grâce à l'enzyme AmpErase (uracil-N-glycosylase) et le désoxyuridine triphosphate (dUTP). En effet, cette enzyme reconnaît et catalyse la destruction des brins d'ADN contenant la désoxyuridine, mais pas l'ADN contenant la désoxythymidine. La désoxyuridine est absente dans l'ADN du virus, et présente dans l'amplicon à cause de son utilisation comme un des dNTP dans le Master Mix. Par conséquent, seul l'amplicon contient de la désoxyuridine. Elle rend l'amplicon sensible à la destruction par l'enzyme AmpErase avant l'amplification de l'ADN viral. Incluse dans le Master Mix, l'enzyme AmpErase catalyse le clivage de l'ADN contenant la désoxyuridine en ouvrant la chaîne de désoxyribose en position C1, ce qui améliore la sensibilité et la spécificité. Au cours du chauffage dans la première étape de cycle thermique, la chaîne d'ADN de l'amplicon se brise à la position de la désoxyuridine, rendant ainsi l'ADN non amplifiable. Par la suite, l'enzyme AmpErase reste inactive à des températures supérieures à 55 °C, c'est-à-dire tout au long des étapes du cycle thermique, et ne détruit donc pas l'amplicon cible formé pendant la phase d'élongation.

d) Détection des produits PCR

L'utilisation de la sonde fluorescente à double marquage permet, en temps réel, la détection de l'accumulation des produits de PCR grâce à un système de surveillance de l'intensité d'émission de la fluorescence libérée au cours du processus d'amplification.

Ces sondes fluorescentes sont des oligonucléotides spécifiques à l'ADN du VHB et au SQ avec de deux (2) marqueurs : un fluorochrome émetteur (**Reporter**) et un fluorochrome récepteur (**Quencher**). Lorsque ces sondes sont intactes, la fluorescence du Reporter est inhibée par la proximité du quencher en raison du transfert d'énergie de type effets Forster.

Au cours de la réaction de PCR, la sonde fluorescente s'hybride sur la séquence cible, puis clivée par l'activité exo-nucléasique 5'→3' de l'ADN polymérase Z05 entraînant une séparation des deux marqueurs. Lorsque les deux fluorochromes sont séparés, le blocage du **Quencher** est interrompu, ce qui entraîne l'émission de son signal fluorescent. Ce même processus se répète pendant un certain nombre de cycles préprogrammé, augmentant ainsi l'intensité de l'émission de la fluorescence des sondes Taqman. L'amplification de l'ADN viral et celle de l'ADN du standard de quantification sont mesurées indépendamment à des longueurs d'ondes différentes, permettant une identification indépendante de l'ADN viral à l'ADN du SQ.

e) Quantification de l'ADN du VHB

Ce test est quantitatif sur une très large plage dynamique puisque la surveillance de l'amplicon est effectuée lors de la phase exponentielle d'amplification. Cependant, l'apparition des signaux fluorescents est définie comme un seuil critique appelé « critical threshold » noté (Ct) : c'est le nombre de cycles fractionnaires où la fluorescence dépasse le seuil prédéterminé, et commence la phase croissance ou exponentielle.

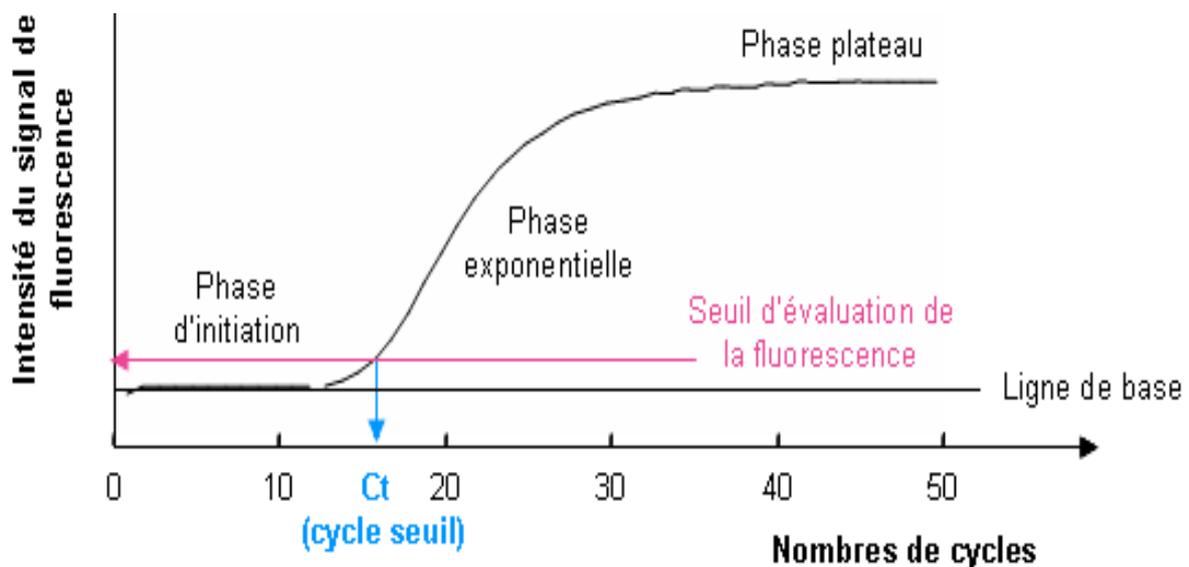


Figure 47 : Variation de l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycle

Le Ct est lié à la quantité d'ADN viral présente dans l'échantillon de départ : Plus la valeur du Ct est faible, plus la charge virale est élevée. Puisque le nombre de molécules d'ADN du SQ est égal dans tous les échantillons, la fluorescence émise par la sonde du SQ apparaît presque au même cycle pour tous les échantillons. Un écart correspondant au double de la charge virale est corrélée avec une diminution d'1 Ct pour l'ADN du VHB cible, tandis qu'un écart correspondant à une dizaine (10) de la charge virale corrèle avec une diminution de 3,3 Ct.

L'analyseur COBAS TaqMan 48 quantifie l'ADN du VHB en utilisant une seconde séquence cible appelée standard de quantification : c'est un fragment d'ADN non infectieux contenant les séquences génomiques du VHB ainsi que les zones de fixation des amorces et génère un produit d'amplification de même taille et de même composition de base que l'ADN viral. Cependant, la région de fixation de la sonde de détection sur le SQ est spécifique ce qui permet de différencier l'amplicon du SQ de l'amplicon cible.

Pendant la phase de dénaturation ou hybridation de la PCR, les échantillons sont excités par la lumière filtrée et l'ensemble des fluorescences émises est collectée pour chaque échantillon.

La lecture de cette fluorescence émise est corrigée à cause des fluctuations instrumentales, puis envoyée par l'instrument au logiciel AMPLILINK et stockée dans une base. Les pré-contrôles sont utilisés pour déterminer si les données de l'ADN du VHB et du SQ sont valides ou pas et des messages d'avertissements sont générés lorsque les données se trouvent en dehors des limites prédéfinies.

Lorsque tous les pré-contrôles sont valides, les fluorescences émises sont traitées pour générer des valeurs Ct pour l'ADN du VHB et pour le SQ. Les constantes d'étalonnage spécifiques au lot fournies sont utilisées pour calculer la valeur du titre pour les échantillons et contrôles en fonction des Ct. Les résultats seront exprimés en Unité internationale par millilitre (UI / ml) ou en copies par millilitre.

Une fois l'analyse terminée, un message **Finished** s'affiche sous l'icône du thermocycleur du logiciel AMPLILINK, et le portoir contenant les 24 tubes K est retiré du thermocycleur à l'aide d'une poignée de manipulation.

Ce portoir est placé sur un support où il se refroidit environ 3 minutes avant de jeter les tubes K utilisés conformément à la réglementation locale en vigueur.

Le Taqman 48 ne dispose pas de système de collecte des déchets. Les tubes K traités sont retirés puis jetés manuellement après chaque analyse. Ces déchets de l'analyseur ainsi que le matériel utilisé et tous les composants mécaniques associés aux déchets présentent un risque biologique potentiel car tout contact avec ces déchets peut provoquer une infection.

f) Analyse et validation des résultats

L'analyseur COBAS TaqMan 48 détermine automatiquement la Concentration d'ADN du VHB dans tous les échantillons et contrôles. Elle est exprimée en Unité internationale (UI) / ml ou en copies / ml. Le facteur de conversion entre le nombre de copies du VHB / ml et le nombre d'UI / ml est **5,82** copies / UI en utilisant le standard international de l'OMS pour l'ADN du virus de l'hépatite B. Si nécessaire, les résultats peuvent être convertis manuellement en copies / ml en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration d'ADN du VHB en UI / ml} \times 5,82 \text{ copies / UI} = \text{nombre de copies / ml.}$$

Exemple: $1.23 \text{ E}+04 \text{ UI / ml} \times 5.82 \text{ copies / UI} = 7.16 \text{ E}+04 \text{ copies / ml.}$

La plage de mesure analytique des valeurs qui peuvent être mesurées sur un échantillon **sans dilution** avec ce test, est de 20 à $1,7\text{E} + 08 \text{ UI / ml}$. Cette gamme peut être rapportée directement de 20 à $1,7\text{E} + 09 \text{ UI / ml}$ sur un échantillon **avec une dilution maximale de 1 à 10**.

Le logiciel AMPLILINK détermine la valeur du cycle seuil (Ct) pour l'ADN du VHB et celui du SQ puis calcule la charge virale en fonction des valeurs de Ct et des coefficients d'étalonnage spécifiques au lot fournis. Il vérifie aussi si le résultat exprimé en UI / ml se trouve dans les plages prédéfinies ou non pour chaque contrôle positif (HC et LPC).

5. Validité d'un lot de contrôles

Trois (3) types de contrôles sont inclus dans chaque lot de test.

- **Le Contrôle négatif** doit produire le résultat "**Target Not Detected**". Lorsque, le négatif contrôle NC est invalide alors le lot entier est invalide.

- **Les Contrôles positifs** : les plages de titres fixées pour les contrôles positifs sont incluses sur les clips de code-barres des cassettes de réactifs utilisées pour le test.

La charge virale exprimée en UI/ml pour le positif control et le High control devrait se situer dans l'intervalle de la gamme de titre fixée pour chaque contrôle. Si, au moins, un des contrôles positifs est marqué invalide, alors le lot entier est invalide. Dans ce cas, l'ensemble du processus devra être répété de la préparation des échantillons à l'amplification.

Cependant, il est nécessaire de vérifier la fenêtre de résultats du logiciel. Un lot est valide si aucun message indicateur n'apparaît pour tous les contrôles. Par contre, le lot est invalide si l'un des indicateurs suivants apparaît pour un contrôle positif ou négatif.

❖ Contrôle négatif

Tableau 1 : *Interprétation d'un contrôle négatif invalide.*

Message d'avertissement	Résultat	Interprétation
NC_INVALID	Non valide	Un résultat invalide

Tableau 2 : Interprétation d'un contrôle positif invalide.

❖ Contrôle positif faible ou Low control

Message d'avertissement	Résultat	Interprétation
LPCINVALID	Invalide	Un résultat invalide ou un contrôle hors limites.

Tableau 3 : Interprétation d'un contrôle positif invalide.

❖ Contrôle positif élevé ou High control

Message d'avertissement	Résultat	Interprétation
HPCINVALID	Invalide	Un résultat invalide ou un contrôle hors limites

Si le lot de contrôle est invalide, alors l'ensemble du processus doit être répété de la préparation des échantillons à l'amplification.

6. Interprétation d'un lot de contrôles valides

Pour un lot valide, les résultats des échantillons sont interprétés comme suit:

Tableau 4 : Interprétation d'un lot de contrôles valides

Résultat du titre	Interprétation
Target Not Detected	L'ADN du VHB est Indétectable.
<20.0E + 01 UI / ml.	La charge virale est inférieure à 20 UI / ml.
≥ 2,00E + 01 UI/ml et ≤ 1,70 E + 08 UI /ml.	La charge virale est comprise entre 20 UI /ml et 1.70E + 08 UI /ml.
> 1.70E + 08 UI /ml	La charge virale est supérieure à 1.70E 08 UI / ml. Dans ce cas, l'échantillon original devra être dilué avec un plasma testé négatif puis anticoagulé à l'EDTA. Le test VHB est repris avec l'échantillon original dilué et le résultat rapporté sera multiplié par le facteur de dilution.

Les échantillons qui sont au-dessus de la limite du test produisent un résultat invalide avec un message suivant : **QS_INVALID**.

Remarque 1: Un résultat du type "**Échec**" est interprété comme suit : l'échantillon n'est pas correctement traité pendant la préparation des échantillons sur l'instrument COBAS AmpliPrep.

Remarque 2 : Un résultat du type "**Invalide**" est interprété comme suit : un résultat invalide.

7. Analyse des données

Dans cette partie de notre étude, nous avons utilisé le logiciel **Epi Info 7**. Il est utilisé par les professionnels de santé publique pour l'étude des épidémies, la gestion des bases de données pour la surveillance de la santé publique et d'autres tâches comme les applications statistiques.

Concernant les tests d'association entre une catégorie de charge virale et l'âge d'une part, et celle qui existe entre une catégorie de charge virale et le sexe d'autre part, nous avons utilisé le Test d'indépendance du khi2 sous forme d'une analyse de régression.

La démarche consiste à formuler l'hypothèse nulle d'indépendance H_0 entre deux variables, puis calculer la probabilité d'observer si l'hypothèse nulle est vraie ou pas. Le résultat obtenu est la probabilité associée au tableau de contingence et est appelé p.overall.

Un seuil de signification noté α de 0,05 fonctionne bien. Si $p.\text{overall} \leq \alpha$, alors l'hypothèse nulle est rejetée. Dans ce cas, l'association entre les deux variables est statistiquement significative.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette partie du travail, les résultats obtenus sont présentés dans des tableaux de fréquences et des graphiques afin de ressortir les informations qui nous permettent de vérifier l'atteinte des objectifs de notre étude.

I. Présentation des résultats

Notre étude a porté sur 874 sujets qui ont répondu aux critères d'inclusion durant la période d'étude. Les résultats qui y ressortent sont regroupés selon les données sociodémographiques, les profils de charge virale, et les tests d'association entre la charge virale, l'âge et le sexe.

1. Répartition selon les données sociodémographiques

A ce point, il s'agit de présenter la répartition de la population étudiée en fonction des données sociodémographiques telles que l'âge et le sexe.

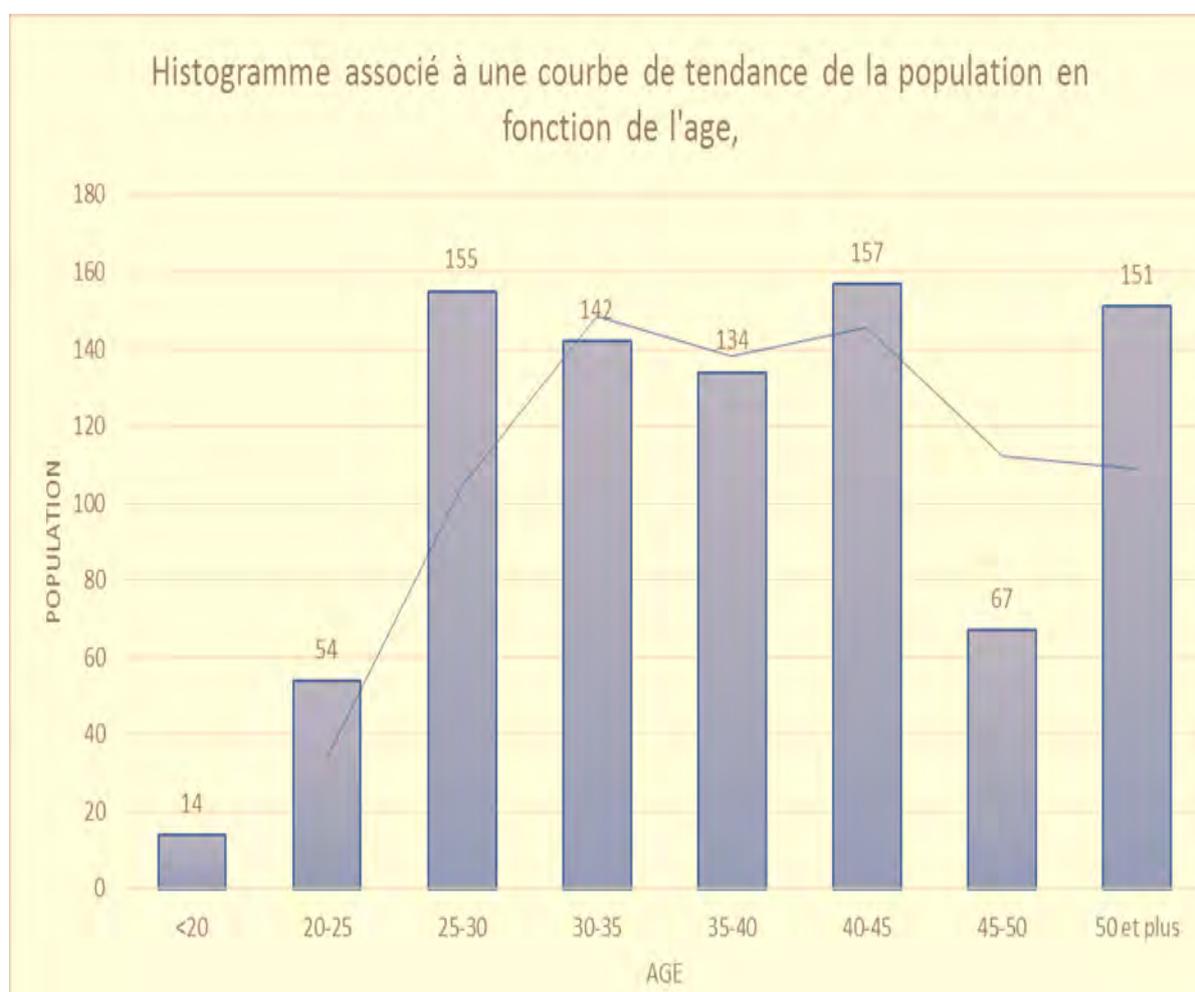


Figure 48: Répartition et évolution de la population en fonction de l'âge.

En terme de répartition, les sujets dont l'âge est compris entre 40 - 45 ans, 25-30 ans et ceux de plus 50 ans sont plus représentatifs avec les pourcentages respectifs **18%** ; **17.7%** et **17.3%**. Les sujets ayant moins de 20 ans sont minoritaires et représentent **1.6%** de la population.

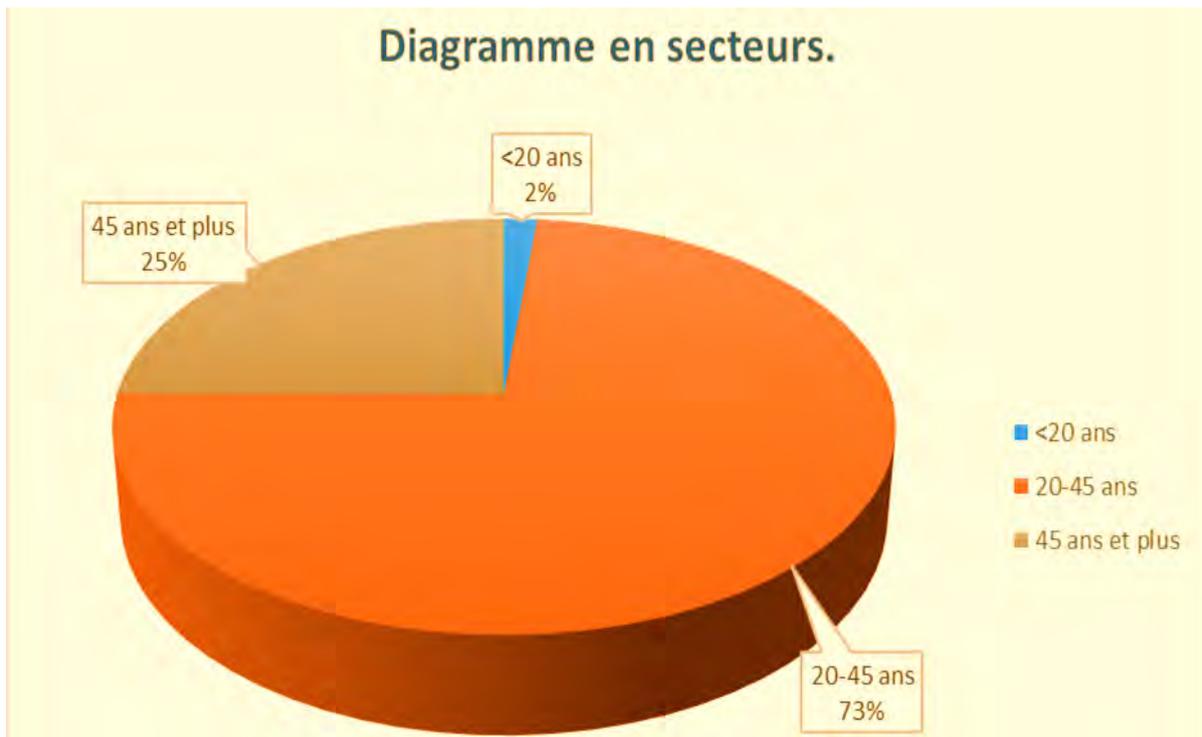


Figure 49 : Répartition de la population d'étude en fonction des trois (3) catégories d'âge.

Il ressort de ce graphique que **73%** de la population ont l'âge compris entre 20 et 45 ans ; **25%** de nos sujets ont plus de 45 ans et **2%** pour ceux qui ont moins de 20 ans.

2. Répartition de la population d'étude selon le sexe

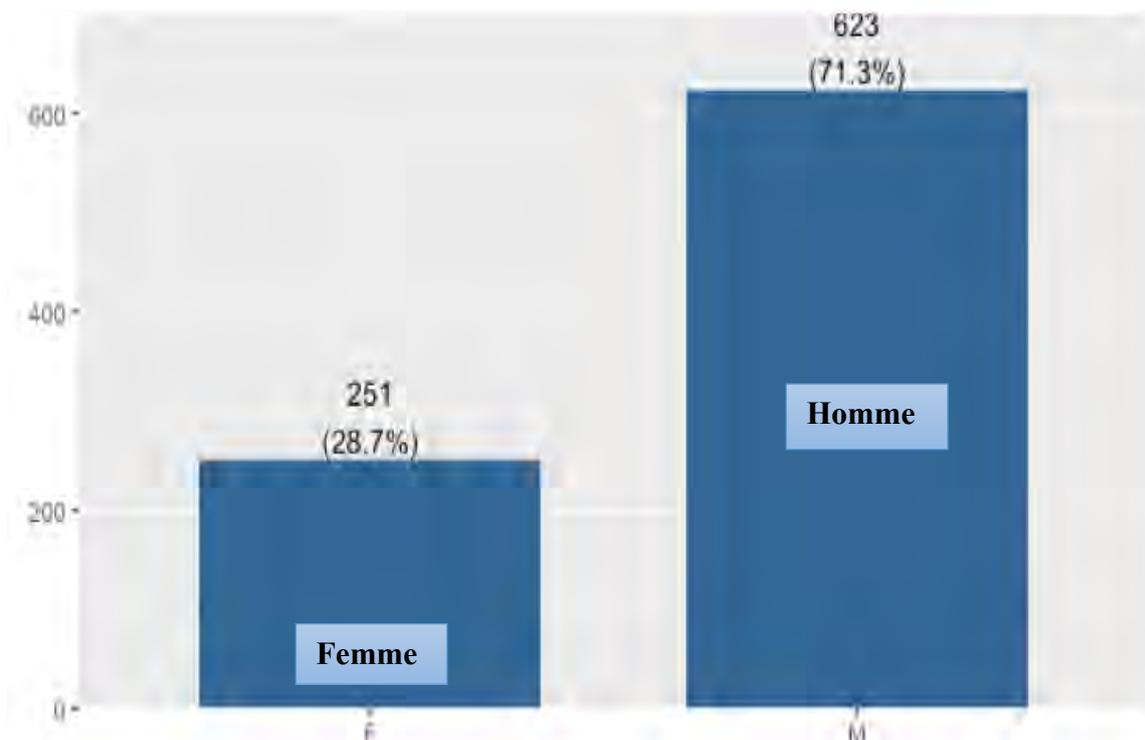


Figure 50: Répartition de la population en fonction du sexe.

De ce graphique, **71.3 %** de la population sont du **sexe masculin** et **28.7%** de **sexe féminin**.

3. Répartition de la population selon les catégories de charge virale

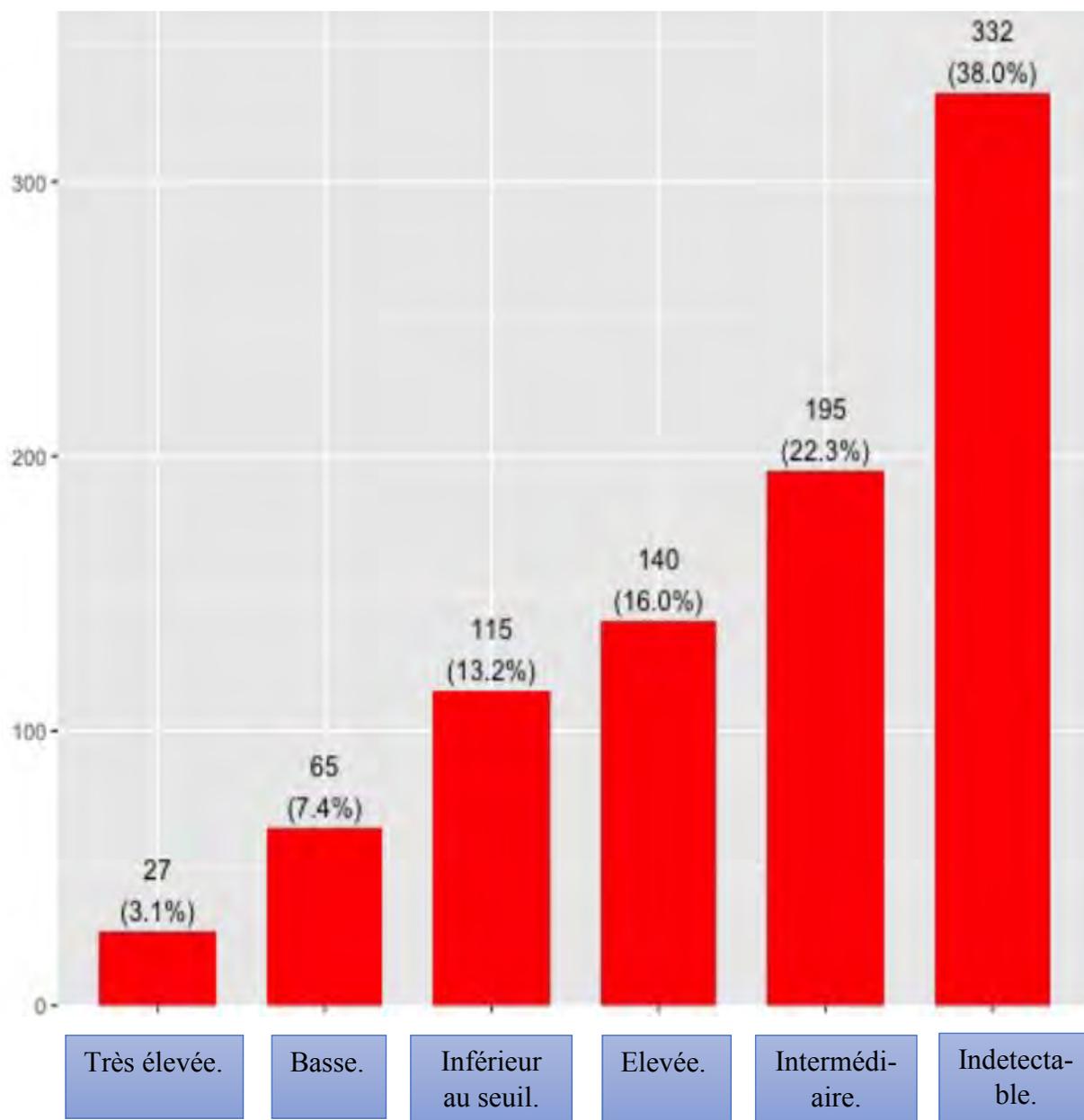


Figure 51 : Répartition de la population en fonction la catégorie de charge virale.

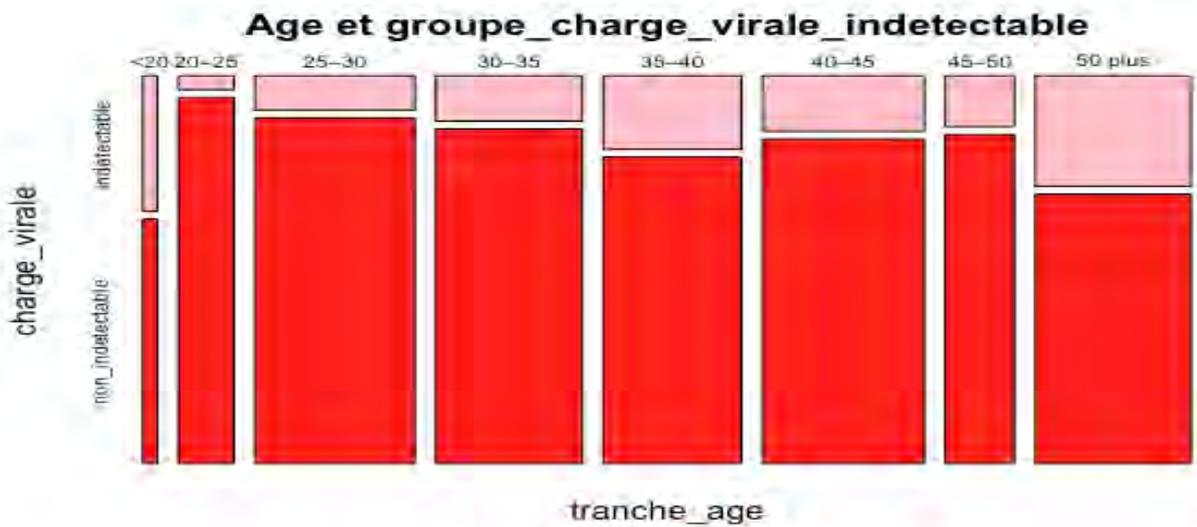
Au vu de ce graphique, nous remarquons que la distribution de la population varie en fonction de la catégorie de charge virale avec des pourcentages divers d'une catégorie à une autre :

- _ La catégorie « **Indéetectable** » (Charge Virale = 0) est majoritaire avec **38%** de la population.
- _ La catégorie « **Intermédiaire** » ($1000 \text{ UI/ml} < CV < 10000 \text{ UI/ml}$), **22.3%** de la population.
- _ La catégorie « **Elevée** » ($10000 \text{ UI/ml} < CV < 100000 \text{ UI/ml}$), **soit 16%** de la population.
- _ La catégorie « **Inférieur au seuil** » (Charge Virale $< 20 \text{ UI/ml}$), **soit 13.2%** de la population.
- _ La catégories « **Basse** » ($20 \text{ UI/ml} < CV < 1000 \text{ UI/ml}$), **soit 7.4%** de la population ;
- _ La catégorie « **Très Elevée** » ($CV > 100000 \text{ UI/ml}$), **soit 3.1%** de la population.

4. Répartition de la Charge virale en fonction de l'âge et sexe.

a) Cas de la charge virale Indétectable

Tableau 5 : Répartition de la charge virale Indétectable en fonction de l'âge et du sexe.

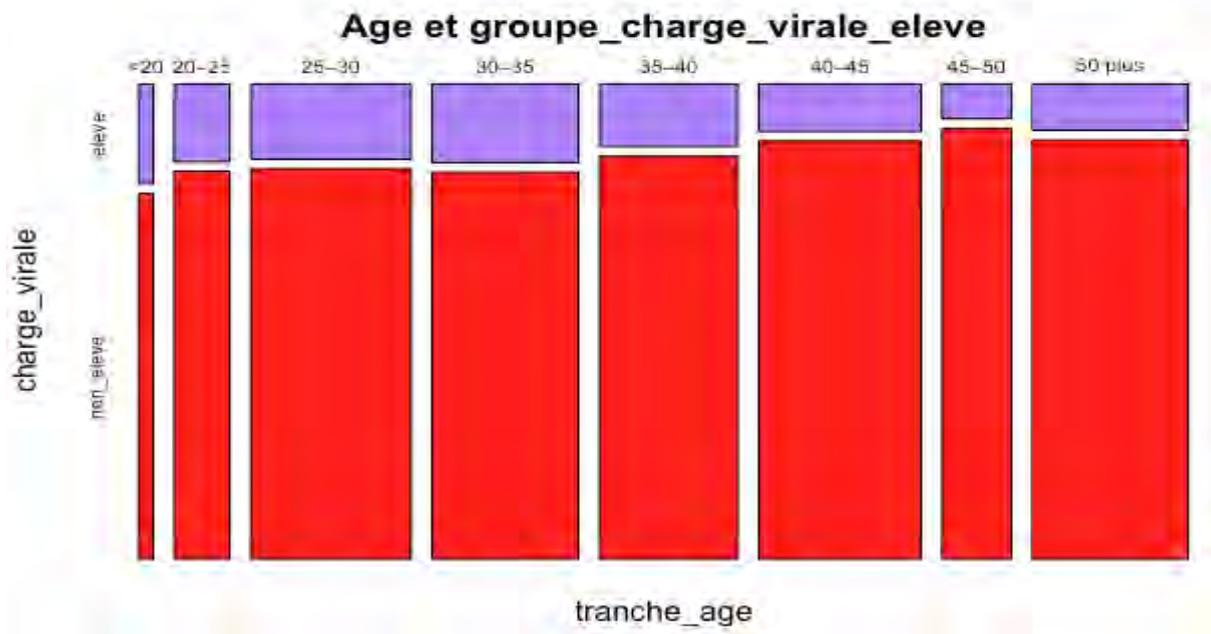


	Indétectable <i>N=140</i>	Détectable <i>N= 734</i>	OR	p.ratio	p.overall
Age	42.9 [40.6;45.3]	37.8 [36.9;38.6]	1.03	<0.0	<0.001
sexe:					0.091
F	35.0%	27.5%	Ref.	Ref.	
M	65.0%	72.5%	0.70		
Tranche d'âge					
<20	3.57%	1.23%	Ref.	Ref.	
20-25	1.43%	7.08%	0.08		
25-30	10.0%	19.2%	0.18		
30-35	12.1%	17.0%	0.25		
35-40	18.6%	14.7%	0.43		
40-45	16.4%	18.3%	0.31		
45-50	6.43%	7.90%	0.28		
50 plus	31.4%	14.6%	0.73		

Au vu de ce tableau, nous notons une association significative entre la charge virale Indetectable et l'âge ($p < 0.001$). En effet, les sujets à charge virale détectable sont plus jeunes (moyenne d'âge de 37.8 ans) que les sujets à charge virale indetectable (moyenne d'âge de 42.9 ans). Par contre, il n'existe pas d'association entre la charge virale indetectable et le sexe ($p = 0.091$).

b) Cas de la charge virale Elevée (forte).

Tableau 6 : Répartition de la charge virale Elevée en fonction de l'âge et du sexe.

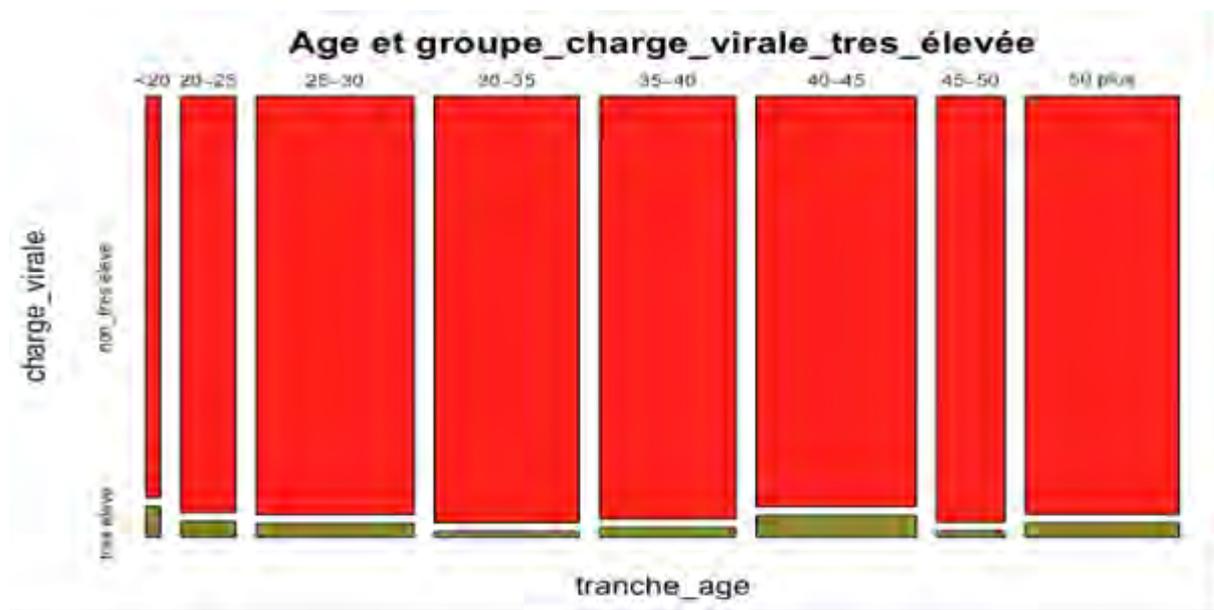


	Elevée N=115	Non Elevée N=759	OR	p.ratio	p.overall
Age	35.8 [33.6;38.0]	39.0 [38.1;39.9]	0.98	0.009	0.008
Sexe:					0.317
F	24.3%	29.4%	Ref.	Ref.	
M	75.7%	70.6%	1.29	0.268	
Tranche d'âge:					
<20	2.61%	1.45%	Ref.	Ref.	
20-25	7.83%	5.93%	0.72	0.674	
25-30	21.7%	17.1%	0.68	0.601	
30-35	20.9%	15.5%	0.72	0.655	
35-40	15.7%	15.3%	0.55	0.432	
40-45	13.9%	18.6%	0.41	0.245	
45-50	4.35%	8.17%	0.30	0.163	
50 plus	13.0%	17.9%	0.40	0.233	

Au vu de ce tableau, nous notons une association significative entre l'âge et la charge virale Elevée ($p=0.008$). En effet, les sujets à charge virale élevée sont plus jeunes (moyenne d'âge de 35.8 ans contre 39.0 ans) que les sujets ayant une charge virale Non Elevée.

Par contre, il n'existe pas d'association entre la charge virale Elevée et le sexe ($p.=0.317$).

Tableau 7 : Répartition de la charge virale Très Elevée en fonction de l'âge et du sexe.



	Non Très Elevée N=847	Très Elevée N=27	OR	p.ratio	p.overal
Age	38.6 [37.8;39.4]	38.1 [32.6;43.7]	1.00 [0.97;1.03]	0.850	0.870
sexe:					0.023
F	29.4%	7.41%	Ref.	Ref.	
M	70.6%	92.6%	4.86		
tranche_age:					0.540
<20	1.53%	3.70%	Ref.	Ref.	
20-25	6.14%	7.41%	0.48		
25-30	17.7%	18.5%	0.40		
30-35	16.5%	7.41%	0.18		
35-40	15.5%	11.1%	0.28		
40-45	17.6%	29.6%	0.63		
45-50	7.79%	3.70%	0.20		
50 plus	17.2%	18.5%	0.41		
	[14.8%;20%]	[6.30%; 38.1%]	[0.06;11.4]	0.500	

Au vu de ce tableau, il existe une association significative entre la charge virale **Très Elevée et le sexe (p=0.023)**. Par ailleurs, les sujets à charge virale très élevée sont **4.86** fois plus fréquents chez les hommes que chez les femmes.

Par contre, il n'existe pas d'association entre la charge virale très élevée et l'âge (p= **0.870**).

II. Discussion des résultats

Nous avons effectué une étude prospective de six mois (Février à Aout 2018) sur des porteurs chroniques du virus de l'hépatite B. Elle avait comme objectif général de décrire les différents profils de charge virale de ces sujets suivis sous traitement antirétroviral à l'hôpital principal de Dakar (Sénégal) par la PCR en temps réel.

Le test VHB COBAS AmpliPrep / Taqman 48 qui est une technique récente de PCR en temps réel, nous a permis de quantifier la charge virale des sujets afin de décrire leur profil virologique (catégorie de charge virale), et de réaliser des tests d'association entre la charge virale et le sexe d'une part, et la charge virale et l'âge d'autre part.

Nous avons inclus 874 sujets bénéficiant d'un suivi biologique régulier. Après cette période de suivi de six (06) mois, l'âge moyen de nos patients était de **38,2 ans** ; avec une prédominance masculine de **71,3%**. Ces résultats concordent avec ceux de Mohammed Ghanim et col qui ont montré une prédominance masculine de **70%** de la population sur une étude réalisée, en Irak, avec une moyenne d'âge de **38 ans**.

1. Caractéristiques sociodémographiques de la population :

Dans notre étude **73%** de nos sujets avaient l'âge compris entre 20 et 45 ans avec une moyenne d'âge de **38,2 ans**. Selon les tranches d'âge, la prévalence de l'AgHBs montre que les classes d'âge prédominantes pour les deux sexes sont celles de **40 - 45 ans** et de **25-30 ans** avec des taux respectifs de **18%** ; **17,7%**. Des résultats similaires ont été retrouvés par Malewe Kolou et coll qui ont montré une prédominance du portage VHB dans les tranches d'âge de 20-29 et 30-39 avec respectivement 26.33% et 21.67% [10]. Cette prédominance du taux d'infection chez les jeunes peut s'expliquer par leurs plus grandes expositions à travers leurs activités sexuelles (rapports non protégés), le multi partenariat et leur interaction au sein de la société par rapport aux enfants et aux personnes âgées.

Chez les sujets âgés de moins de 20 ans, la prévalence de l'AgHBs est de **1,6%** de la population. Ceci peut être expliqué par le fait que cette tranche d'âge est moins fréquente au dépistage. De plus, le Sénégal est une zone de forte endémie où les modes de transmission les plus fréquents sont la transmission mère-enfant et la transmission horizontale intrafamiliale. En conséquence, la plus part des infections se produisent à la naissance ou même au cours des premières années de la vie où le risque de développer une hépatite chronique, bien avant 20 ans, est très important. Quelle que soit la tranche d'âge, la prévalence est toujours élevée chez les hommes par rapport aux femmes avec globalement **71,3% d'hommes** contre **28,7%** de femmes. Ces résultats sont assez proches de ceux d'Ouédraogo où 66,9 % de la cohorte étaient de sexe masculin [34].

Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que dans notre société, la majorité de la population active est de sexe masculin dans les foyers susceptibles d'être des sources de contamination.

2. Catégories de Charge virale B de la population

Notre population d'étude est répartie en six (6) groupes selon la valeur de la charge virale :

- _ "**Indétectable**" : si la charge virale (c.v) est égale à zéro (**38% de la population d'étude**);
- _ "**Inférieur au seuil**" : si la c.v est inférieure à 20 UI/ml (**13.2% de la population d'étude**) ;
- _ "**Basse**" : si la c.v est comprise entre 20 et 1000 UI/ml (**7.4% de la population d'étude**);
- _ "**Intermédiaire**" : si la c.v est comprise entre 1000 et 10000 UI/ml (**22.3% la population**) ;
- _ "**Elevée**" : si la c.v est comprise entre 10000 et 100000 UI/ml (**16% de la population d'étude**);
- _ "**Très Elevée**" : si la c.v est supérieure à 100.000 UI/ml (**3.1% de la population d'étude**).

Le groupe d'étude REVEAL (évaluation du risque d'hépatopathie associée à l'élévation de la virémie) a montré qu'un taux initial d'ADN du VHB (élevé > 10 000 copies / ml) est associé à une augmentation significative du risque de CHC et à une progression vers une cirrhose [35].

De plus, le maintien à des niveaux élevés d'ADN du VHB est associé à une maladie hépatique progressive [36]. Des taux élevés d'ADN du VHB constituent un facteur de risque de la cirrhose et du Carcinome Hépatocellulaire en Asie [37] - [38].

Avec l'instauration du traitement, les patients appartenant aux groupes « Elevée » (16%) et « Très Elevée » (3.1%) présentent une charge virale supérieure à 10.000 copies/ml. Evaluée sur notre population, **19.1%** de la population présentent une charge virale supérieure à 10.000 copies/ml, et par conséquent un risque de CHC ou une progression vers une cirrhose. Cela peut être dû par une prise en charge très tardive de la maladie due à une méconnaissance de l'hépatite B aussi bien que les modes de transmission et de prévention.

Par contre, **80.9%** des patients possèdent donc une virémie inférieure à 10.000 copies/ml. Cela peut s'expliquer par une prise en charge précoce du patient d'une part, mais aussi une efficacité du traitement élaboré lors de la prise en charge.

3. Variation de la Charge virale en fonction de l'âge et du sexe

En montrant l'association entre la charge et l'âge, il s'est révélé que les charges virales élevées étaient trouvées chez les jeunes, cela révèle que certaines actions vont pouvoir être entreprises telles que la sensibilisation des sujets jeunes sur le risque de transmission sexuelle afin de réduire la propagation de la maladie.

Le fait de savoir également que les charges virales élevées sont plus fréquentes chez les hommes va permettre de définir un plan d'action ciblé tel que la recommandation du port de préservatifs lors des rapports sexuels, surtout chez les hommes à risque.

CONCLUSION

L'infection par le virus de l'hépatite B constitue un problème majeur de santé publique. La prise en charge des hépatites chronique inclut de façon parallèle le contrôle de la réplication par les analogues nucléos(t)idiques d'une part, et la surveillance de l'efficacité du traitement qui se traduit par une réduction de la charge virale plasmatique jusqu'à l'obtention d'une charge virale Indétectable à l'absence de résistance virale, d'autre part.

Ce mémoire avait pour objectif général de décrire les différents profils de charge virale des porteurs chroniques de l'hépatite B suivis sous traitement antirétroviral à l'hôpital principal de Dakar (Sénégal).

Nous avons inclus 874 patients suivis sous traitement durant toute notre étude allant de Février à Aout 2018. L'âge moyen de nos sujets est de **38,2 ans** avec une prédominance masculine de **71.3%**. Grâce au test de PCR en temps réel réalisé avec le Cobas Ampliprep / Taqman 48, nous sommes parvenus à quantifier la charge virale de tous les sujets de notre population. Ceci nous a permis de définir les différents profils des sujets en fonction de la charge virale plasmatique :

- _ **Indétectable** : si la charge virale est égale à zéro (**38%**);
- _ **Inférieur au seuil** : si la charge virale est inférieure à 20 UI/ml (**13.2%**);
- _ **Basse** : si la charge virale est comprise entre 20 et 1000 UI/ml (**7.4%**);
- _ **Intermédiaire** : si la charge virale est comprise entre 1000 et 10000 UI/ml (**22.3%**);
- _ **Elevée** : si la charge virale est comprise entre 10000 et 100000 UI/ml (**16%**);
- _ **Et Très Elevée** : si la charge virale est supérieure à 100.000 UI/ml (**3.1%**).

Le croisement de ces différents profils de charge virale avec l'âge et le sexe a montré :

- _ Une très forte association entre la charge virale « **Indetactable** » et l'**âge** (**p = 0,001**) ;
- _ Une forte association entre la charge virale « **Elevée** » et l'**âge** (**p = 0,008**).
- _ Une association entre la charge virale « **Très Elevée** » et le sexe (**p = 0,023**).

Ces résultats nous ont permis d'élaborer des plans d'actions ciblés pour endiguer cette endémie d'hépatite B. Parmi ces stratégies, on peut citer :

- ❖ La sensibilisation des jeunes sur les risques liés à la transmission sexuelle afin de réduire la propagation de la maladie.
- ❖ La lutte contre la transmission sexuelle du virus par le port de préservatif lors des rapports sexuels, surtout chez les hommes à risque.

Ce travail contribue à l'élimination de l'hépatite B comme menace de santé publique à l'échelle nationale, ce qui témoigne le caractère essentiel de la quantification de la charge virale dans la prise en charge des hépatites.

Recommandations :

Sachant que le Sénégal est une zone de forte endémie caractérisée par la transmission verticale venant des mamans porteuses chroniques, et que l'âge de la première infection est un facteur impliqué dans le portage chronique, des mesures préventives s'avèrent indispensables :

A l'endroit des autorités

- Assurer la gratuité du dépistage AgHBs prénatal à toutes les mères porteuses permettant ainsi une prise en charge précoce du nouveau-né, la disponibilité des antirétroviraux particulièrement aux femmes et aux enfants porteurs.
- Vacciner la population, en particulier le personnel soignant, apparaît comme le seul moyen efficace de faire baisser la prévalence de l'infection par le VHB. C'est évident que le coût d'une telle politique ne permet pas à l'heure actuelle son application, cependant la vaccination contre le VHB doit être introduite dans le Programme élargie de vaccination.
- Mettre en place une stratégie politique pour soutenir de façon continue la PCR en temps réel.
- Dépistage et vaccination de l'entourage des patients dépistés positifs pour l'AgHBs.
- Mettre à la disposition de la population les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD).

A l'endroit du personnel soignant

- Bien expliquer aux femmes enceintes l'importance du test prénatal, en particulier celui du VHB, et de la prise en charge précoce de cette infection.
- Renforcer la sensibilisation de la population sur les précautions universelles d'asepsie (actes de tatouage, de piercing, partage du matériel d'injection), et sur les comportements sexuels à risque de transmission (multi-partenariat ; partenaire sexuel à AgHBs positif..).

A l'endroit des patients

- Suivre rigoureusement les visites prénatales des femmes enceintes pour minimiser les risques de transmission du VHB à l'enfant lors de la grossesse, l'accouchement et l'allaitement.
- Assurer un suivi régulier de l'enfant jusqu'à la confirmation d'un résultat négatif à 18 mois.

Annexes

Les réactifs destinés au test VHB sont répartis en 4 cassettes préremplies et prêtes à l'usage. Elles sont numérotées respectivement dans l'ordre CS1, CS2, CS3 et CS4.

- La cassette CS1 contient de particules magnétiques de verre et une solution d'isopropanol à 93%
- La cassette CS2 est la cassette de réactif de lyse. Elle contient du dihydrate de citrate de sodium, du thiocyanate de guanidine à 42,5%, du polydocanol à moins 14% et du dithiothréitol à 0,9%.
- La cassette CS3 : c'est la cassette de multi réactifs, contenant une solution de protéinase et un tampon d'élution ;
- La cassette CS4 : c'est la cassette de réactifs spécifiques au test VHB. Elle contient :
 - Le standard de quantification SQ du VHB : c'est un fragment d'ADN non infectieux contenant des séquences de liaison aux amorces VHB et un site unique de liaison à la sonde ainsi que de l'azide de sodium ;
 - Le master-mix : c'est le mélange réactionnel du test VHB. Le master-mix est constitué des déoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), d'amorces sens et anti-sens, de sondes oligonucléotidiques fluorescentes et spécifiques au VHB et SQ, d'ADN polymérase, d'enzyme Ampérase (Uracile-N-glycosylase) et d'azide de sodium ;
 - Une solution de sel de manganèse qui sert de tampon. Les réactifs destinés au test VHB sont conservés entre 2 et 8°C et restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée tant que le flacon n'est pas ouvert. Après ouverture du flacon, ces réactifs restent stables pendant 28 jours. Chaque kit contient des réactifs en quantité suffisante pour 72 tests, qui peuvent être effectués en lots de 12 à 24 tests.

Le réactif de lavage est constitué de dihydrate de citrate de sodium et de Nméthylisothiazolone-HCl à 0,1%. Le réactif de lavage reste stable jusqu'à la date de péremption indiquée. Après ouverture du flacon, il reste stable pendant 28 jours à 2-30° C ou jusqu'à la date de péremption si celle-ci survient en premier.

Références bibliographiques :

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/fr/>.
2. Aurélie Velay Rusch, Influence des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur la disparition de l'antigène HBs circulant lors du traitement de l'hépatite chronique B par analogues nucléos(t)idiques : Mécanisme moléculaires impliqués et développement d'un traitement immunomodulateur à base d'anticorps monoclonaux. Science de la Vie et de la Santé. Université de Lorraine, 2015.
3. Mémoire Bassirou Dieye, Analyse du cout de l'hépatite B au Sénégal et estimation du rapport cout-efficace, Institut Supérieur de management et de la Santé, économie de la santé, 2012.
4. Fatoumata Traoré, Dépistage de l'hépatite B chez les migrants originaires d'Afrique subsaharienne et d'Asie: étude qualitative sur les freins des médecins généralistes. Université de Paris Diderot-Paris 7, 2014.
5. Michel ML. Immunopathogénèse et approches vaccinales thérapeutiques de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B. Virologie 2014; 18(1) : 25 - 33
doi:10.1684/vir.2014.0546
6. Mme Fatima BAADI, La séroprévalence de l'hépatite virale B dans la région de Marrakech, Université de CADI AYYAD, 2016.
7. P. Roingard, A. Diouf, J. L. Sankale, C. Boye, S. Mboup, F. Diadhiou, and M. Essex. Perinatal transmission of hepatitis B virus in Senegal, West Africa. Viral Immunology, 6(1):65–73, 1993.
8. Abdoul A Ndiaye, Ibrahima Socé Fall, Gora Lo, Sidy Mouhamed Seck, Alioune Badara Tall, Boubacar Gueye, Amady Barro Mbodj, and Anta Tal-Dia. HBsAg seroprevalence among Senegalese militaries. Military Medical Research, 2, February 2015.
9. A. A. Fall. Etude de quelques modèles épidémiologiques : application à la transmission du virus de l'hépatite B en Afrique subsaharienne (Sénégal) Systèmes dynamiques [math.DS]. Université de Metz, 2010. Français. <tel-00857686>
10. OMS en ligne : <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
11. Michel ML. Immunopathogénèse et approches vaccinales thérapeutiques de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B. Virologie 2014; 18(1) : 25-33
doi:10.1684/vir.2014.0546
12. Julie Lucifora, Fabien Zoulim. Traitement de l'hépatite chronique B et mécanismes de la résistance aux antiviraux, Hépatogastro, vol. 14, numéro spécial, septembre 2007
doi: 10.1684/hpg.2007.0142

13. Marion Gruffaz. La protéine Core du virus de l'hépatite B est le déterminant majeur responsable de l'inhibition précoce de la réponse IFN dans les hépatocytes. *Virologie*. Université Claude Bernard -Lyon I, 2013. Français. <NNT : 2013LYO10090>.
14. Gaëtan Billioud, Malika Ait-Goughoulte, Fabien Zoulim Cycle de réplication du VHB et molécules antivirales, *Virologie* 2010, 14 (supplément 1) : S57-S73 doi: 10.1684/vir.2010.0301
15. Vincent Thibault, La résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques, *Virologie* 2010, 14 (supplément 1) : S35-S50 doi: 10.1684/vir.2010.0299
16. T.asselah, O.lada, N.boyer, M. martinot, P. marcellin. Traitement de l'hépatite B, *gastroentérologie clinique et biologique* 2008, 32, 749-768 Doi 10.1016/j.gcb.2008.07.001
17. C. Doerig, A. Antonino, I. Pache D. Moradpour : Prise en charge de l'hépatite B chronique : un défi en évolution constante, *Rev Med Suisse* 2010 ; 6 : 168-73
18. Stanislas Pol. Traitement de l'infection virale B chronique Le point de vue de l'hépatologue sur la tolérance rénale. *HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive* vol. 17 no 1, janvier-février 2010 doi: 10.1684/hpg.2010.0387
19. Docteur Aicha BENSALÉM-BOUTAA (Laboratoire des Hépatites Virales de l'institut Pasteur d'Algérie), Place de la PCR, en temps réel, dans les hépatites B et CN°08 - Juillet 2012 Santé-MAG
20. MONDEILH AUDE, Évolutions de la prise en charge de l'hépatite B en Afrique Subsaharienne : Enjeux et perspectives, Université Toulouse III Paul Sabatier 2014.
21. Baruch S. Blumberg. Virus-Like Particles in Australia Antigen-Associated Hepatitis.
22. Amina SBAI, épidémiologie, génotype et facteur de risque de l'hépatite virale B au Maroc, Université Mohammed V ADGAL, virologie, 2012.
23. hepatitis-info service.org. Image : Hépatites Virologie.
24. Nora Martel. Variabilité génétique du virus de l'hépatite B et implication sur le diagnostic et la pathogénèse. *Sciences agricoles*. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. <NNT : 2012LYO10026>. <tel-00865253>
25. Charlotte Lepère - Douard. Analyse du mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite B : Identification d'un nouveau déterminant de l'infectivité. *Biologie cellulaire*. Université Rennes 1, 2009. Français. <tel-00498099>
26. David Milich and T. Jake Liang. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 38(5):1075–1086, November 2003.

27. Shuaibu A. Hudu, Mohd T. Niazlin, Syafinaz A. Nordin, Mohammed I. Saeed, Soek S. Tan, Haniza Omar, Hamiza Shahar, and Zamberi Sekawi. Quantitative Hepatitis B e Antigen: A Better Predictor of Hepatitis B Virus DNA than Quantitative Hepatitis B Surface Antigen. *Clinical Laboratory*, 64(4):443–449, April 2018.
28. Manuel d'utilisation COBAS AmpliPrep, COBAS TaqMan 48 Analyzer, version manuell.3, juin 2013.
29. Roche. Système COBAS AmpliPrep.
30. En ligne : <http://www.hopitalprincipal.sn/hopital.htm>
31. En ligne : https://www.memoireonline.com/02/12/5279/m_Tableau-de-bordprospectif-de-lhopital-principal-de-Dakar2.html
32. Manuel électronique COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, version 2.0
33. BioMagPure. Image: Purification de fragments PCR par billes magnétiques – Nettoyage.
34. R. Sombié, A. Bougouma, O. Diallo, G. Bonkougou, R. Cissé, L. Sangare, R. Sia, K. Serme, and D. Ilboudo. Hépatite B chronique: aspects épidémiologique, diagnostique, thérapeutique et évolutif au centre hospitalier universitaire Yalgado Ouédraogo de Ouagadougou. *Journal Africain d'Hépatogastroentérologie*, 4(1):3–10, January 2010.
35. Chien-Jen Chen, Hwai-I. Yang, Jun Su, Chin-Lan Jen, San-Lin You, Sheng-Nan Lu, Guan-Tarn Huang, Uchenna H. Iloeje, and REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*, 295(1):65–73, January 2006.
36. Uchenna H. Iloeje, Hwai-I. Yang, Chin-Lan Jen, Jun Su, Li-Yu Wang, San-Lin You, Chien-Jen Chen, and Risk Evaluation of Viral Load Elevation and Associated Liver Disease/Cancer-Hepatitis B Virus Study Group. Risk and predictors of mortality associated with chronic hepatitis B infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 5(8):921–931, August 2007.
37. G. Fattovich, N. Olivari, M. Pasino, M. D'Onofrio, E. Martone, and F. Donato. Long-term outcome of chronic hepatitis B in Caucasian patients: mortality after 25 years. *Gut*, 57(1):84–90, January 2008.
38. Rosa Zampino, Adriana Boemio, Caterina Sagnelli, Loredana Alessio, Luigi Elio Adinolfi, Evangelista Sagnelli, and Nicola Coppola. Hepatitis B virus burden in developing countries. *World Journal of Gastroenterology*, 21(42):11941–11953, November 2015.

Références bibliographiques.