

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTÉ DE MÉDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNÉE 2018

N° 133

**Quantification de la charge virale du Virus de l'Hépatite B (VHB):
Comparaison entre les techniques de PCR en temps réel *AmpliX®* et
COBAS AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ HBV (CAP/CTM HBV).**

MÉMOIRE DE MASTER EN MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE

PRESENTÉ ET SOUTENU PUBLIQUEMENT

Le 31 Juillet 2018

Par

Docteur Anna Julienne Selbé NDIAYE

Née le 13 Mars 1990 à Kaolack (SENEGAL)

MEMBRES DU JURY

Président :	M.	Cheikh Saad-Bouh	BOYE	Professeur
Membres:	Mme	Ndèye Coumba	TOURE KANE	Professeur
	Mme	Halimatou DIOP	NDIAYE	Maître de conférences agrégé
Directeurs de mémoire :	Mme	Halimatou DIOP	NDIAYE	Maître de conférences agrégé
	M.	Gora	LO	PHD, Pharmacien biologiste



Dédicaces

Ce travail est dédié

A mon papa Barth,

A ma maman Marie,

A mon frère Thomas

A mes sœurs Joséphine, Georgette, Marie Benjamin, Marie Andrée

A toute la famille...



Remerciements

A tout le personnel de l'unité de biologie moléculaire du laboratoire de bactériologie virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec et de l'Institut de Recherche en Santé, de Surveillance Epidémiologique et de formation (IRESSEF)

A tout le personnel du laboratoire du Centre Médical Inter Armées (CMIA) de Dakar

A mes Maîtres du Master de Microbiologie Fondamentale et appliquée particulièrement au Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE

Au Dr Gora Lô : vous avez pleinement contribué à la réalisation de ce travail **MERCI POUR TOUT**

A mes promotionnaires du Master de Microbiologie fondamentale et appliquée

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



A nos maîtres et juges

**A Notre maître et Président de Jury,
Monsieur le Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE**

Nous vous sommes infiniment reconnaissants pour le grand honneur et le privilège que vous nous faites en acceptant de présider la soutenance de notre mémoire de Master.

Votre disponibilité, votre compétence et vos éminentes qualités intellectuelles font de vous un maître estimé et respecté par tous.

Qu'il nous soit permis, cher maître, de vous exprimer notre plus haute considération et nos sincères remerciements.

**A Notre maître
Le Professeur Ndèye Coumba TOURE KANE**

Nous ne saurions vous exprimer à sa juste valeur notre reconnaissance pour tout ce que vous avez réalisé à l'endroit de notre modeste personne.

Votre rigueur scientifique, votre grandeur d'esprit, votre gentillesse, et votre modestie sont autant de qualités qui suscitent le respect et l'admiration.

Veillez trouver ici, cher maître, nos vifs remerciements et notre profonde gratitude.

**A Notre maître et directrice de mémoire
Le Professeur Halimatou DIOP NDIAYE**

Vous avez accepté avec spontanéité la direction de ce travail de mémoire de Master malgré vos multiples obligations professionnelles.

Grâce à votre soutien sans faille, vos directives rigoureuses, vos conseils judicieux, votre disponibilité que nous avons pu aboutir à l'élaboration de ce document. Votre souci constant du travail méthodique restera pour nous un modèle à suivre.

Vous n'avez cessé de nous fasciner par votre simplicité, la qualité de vos enseignements et l'ampleur de votre expérience.

Soyez assurée de notre sincère et profonde reconnaissance

Liste des abréviations

aa	Acide amine
Ac	Anticorps
Ac anti HBe	Anticorps dirigé contre la protéine E du virus de l'hépatite B
Ac anti HBc	Anticorps dirigé contre la protéine de capsid de l'hépatite B
Ac anti HBs	Anticorps dirigé contre la protéine de surface de l'hépatite B
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN-RC	Acide désoxyribonucléique relâché circulaire
AgHBe	Protéine E du virus de l'hépatite B
AgHBc	Protéine de capsid du virus de l'hépatite B
AgHBs	Protéine de surface du virus de l'hépatite B
AgHBx	Protéine X du virus de l'hépatite B
ALAT	Alanine aminotransférase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNpg	ARN pré-génomique
ASAT	Aspartate aminotransférase
cccDNA	Desoxyribonucleic acid covalently closed circular
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CMIA	Centre Médical Inter Armées
CI	Contrôle Interne
CMIA	Chemiluminescent Microparticle Immunoassay
COFRAC	Comité Français d'accréditation
CPF	Cancer Primitif du Foie
CSHPF	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
CV	Charge Virale
dATP	désoxy adénine tri-phosphate
dCTP	désoxy cytosine tri-phosphate
dGTP	désoxy guanine tri-phosphate
dNTP	désoxyNucléotide TriPhosphate
dUTP	désoxy uridine tri-phosphate
DR1	Direct Repeat 1

DR2	Direct Repeat 2
EASL	European Association for the Study of the Liver
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ET	Ecart Type
EDTA	acide Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
G	Glycine
HBSP	Hepatitis B Spliced Protein
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	Protéine transactivatrice du virus de l'hépatite B
IFN	Interféron
IgM	Immunoglobuline de type M
IgG	Immunoglobuline de type G
INVS	Institut de Veille Sanitaire
K	Lysine
kDa	kiloDalton
Log	Logarithme
ml	Millilitre
MOTC	Microtubule Organizing Center
MT	Microtubule
NF-Kb	nuclear factor-kappa B
NLS	Signal de localisation nucléaire
nm	Nanomètre
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame
PBC	Promoteur Basal du Core
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Prégénomique
PNLH	Programme National de Lutte contre les Hépatites
Pol	Polymérase
QS	Quantification Standard
R	Arginine
R E	Réticulum endoplasmique
R T	Reverse Transcriptase

T CD4+	Lymphocytes T CD4 (cluster de différenciation 4)
TCD8+	Lymphocytes TCD8 (cluster différenciation 8)
UDG	uracil-ADN-glycosylase
μl	Microlitre
UI	Unités Internationales
VHB	Virus de l'hépatite B
VHD	Virus de l'Hépatite D
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WGO	World Gastroenterology Organisation
WHO	World Health Organisation
YMDD	Tyrosine-méthionine-aspartate-aspartate
YIDD	Tyrosine-isoleucine-aspartate-aspartate
YVDD	Tyrosine-valine-aspartate-aspartate

Liste des figures

Figure 1: Différents types de particules virales du VHB	7
Figure 2: Organisation du génome du virus de l'hépatite B.....	9
Figure 3: Cycle répliatif du virus de l'hépatite B	13
Figure 4: Répartition géographique des différents génotypes du virus de l'hépatite B	16
Figure 5: Répartition mondiale de la prévalence du portage de l'AgHBs	21
Figure 6: Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite B aiguë d'évolution favorable.....	29
Figure 7: Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite chronique.....	31
Figure 8: Diagramme de levey-jennings du niveau de concentration $4 \log_{10}$ UI/ml	47
Figure 9: Diagramme de levey-jennings du niveau de concentration $7 \log_{10}$ UI/ml	47
Figure 10: Droite de régression CobasTaqman™ vs Amplix®	51
Figure 11: Bland-Altman Amplix® vs CobasTaqman™.....	52

Liste des tableaux

Tableau I: Correspondances entre les géotypes et les sérotypes du VHB et présentation des différences génétiques principales entre les géotypes.....	17
Tableau II: Diagnostic d'une hépatite B.....	28
Tableau III: Résultats de la répétabilité de la technique Amplix	45
Tableau IV: Résultats de l'analyse de reproductibilité intra-laboratoire de la technique Amplix.....	46
Tableau V: Charge virale plasmatique des échantillons avec la technique COBAS TaqMan™	49
Tableau VI: Charge virale plasmatique des échantillons avec la technique AmpliX® (HBV)	50
Tableau VII: Comparaison des charges virales obtenues avec les 2 techniques	51
Tableau VIII: Comparaison opérationnelle Cobas Taqman™ vs Amplix®	53

Table des matières

Introduction	1
Première partie : Revue bibliographique	4
1. Définition et historique de l'hépatite B	5
1.1. Définition	5
1.2. Historique	5
2. Taxonomie et structure du virus de l'hépatite B	6
2.1. Taxonomie.....	6
2.2. Structure du virus de l'hépatite B.....	6
2.2.1. Organisation structurale du virus	6
2.2.2. Organisation génomique du virus	8
2.3. Les protéines virales.....	9
2.3.1. Les protéines d'enveloppe.....	9
2.3.2. Les protéines de core et précore	10
2.3.3. La polymérase virale	11
2.3.4. La protéine X.....	11
2.3.5. L'Hepatitis B Spliced Protein	12
3. Cycle de réplication du VHB	12
4. La variabilité génomique du virus de l'hépatite B	14
4.1. Mutations ponctuelles	14
4.2. Sérotypes	15
4.3. Génotypes.....	15
5. Epidémiologie de l'infection par le virus de l'hépatite B	17
5.1. Modes de transmission	18
5.1.1. La transmission parentérale.....	18
5.1.2. La transmission sexuelle	18
5.1.3. La transmission verticale.....	19
5.1.4. La transmission horizontale	19
5.2. La répartition géographique de l'hépatite B.....	19
5.2.1. Zones de forte endémie	20
5.2.2. Zones d'endémie intermédiaire	20

5.2.3. Zones de forte endémie	20
6. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B	21
6.1. Pathogénèse	23
6.2. Symptomatologie	23
6.2.1. L'hépatite B aiguë	23
6.2.2. L'hépatite B chronique	24
6.2.3. Le virus de l'hépatite B et le cancer du foie	24
7. Diagnostic au laboratoire de l'infection par le VHB	25
7.1. Diagnostic biologique direct de l'infection par le VHB	25
7.1.1. La culture	25
7.1.2. La microscopie électronique	26
7.1.3. La recherche des antigènes viraux	26
7.1.4. Détection et quantification de l'ADN du VHB	27
7.2. Diagnostic indirect de l'infection par le virus de l'hépatite B	27
7.3. Cinétique des marqueurs	28
7.3.1. Au cours d'hépatites aiguës d'évolution favorable	28
7.3.2. Au cours d'hépatites fulminantes	29
7.3.3. Au cours d'hépatites chroniques	30
7.4. Apport de la charge virale dans le suivi de l'évolution de l'hépatite B chronique	31
8. Traitement de l'infection par le virus de l'hépatite B	32
9. Prévention de l'infection par le VHB	33
Deuxième partie : travail expérimental	35
Chapitre I: Justificatif, cadre, type et période de l'étude et échantillonnage	36
1. Justificatif de l'étude	36
2. Cadre, type et période de l'étude	37
3. Echantillonnage	37
Chapitre II : Méthodologie	38
1. Matériel et réactifs	38
2. Méthode	38
3. Evaluation des critères de performance de la technique de PCR en temps réel <i>AMPLIX</i> ®	
<i>HBV</i>	38
3.1. Répétabilité	38

3.2. Reproductibilité ou fidélité intermédiaire	39
3.3. Justesse et Incertitude.....	39
3.4. Contamination entre les échantillons	40
3.5. Comparaison de la technique <i>AMPLIX® HBV</i> avec une technique de référence (<i>Cobas Taqman</i>)	40
4. Dosage de l'ADN du VHB par la technique <i>Cobas AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ HBV (CAP/CTM HBV)</i>	41
4.1. Principes de quantification	41
4.1.1. Extraction	41
4.1.2. Addition du master mix.....	42
4.1.3. Amplification Détection	42
5. Mesure de la charge virale du VHB par la technique de PCR en temps réel <i>AMPLIX® HBV</i>	43
5.1. Principes de quantification	43
5.1.1. Extraction	43
5.1.2. Amplification Détection.....	43
6. Analyse statistique des données	44
Chapitre III : Résultats	45
1. Etude des critères de performance de la technique de PCR en temps réel <i>AMPLIX® HBV</i> ..	45
1.1. Répétabilité.....	45
1.2. Reproductibilité.....	46
1.3. Justesse et incertitude	48
1.4. Contamination	49
1.5. Comparaison des méthodes <i>AmpliX® (HBV) versus CobasAmpliPrep™/COBAS TaqMan™ HBV (CAP/CTM HBV)</i>	49
1.5.1. La charge virale plasmatique par <i>Cobas AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ HBV (CAP/CTM HBV)</i>	49
1.5.2. La charge virale plasmatique par <i>AmpliX® (HBV)</i>	50
1.5.3. Corrélacion et concordance entre les 2 techniques	50
2. Comparaison opérationnelle des 2 techniques	53
Chapitre IV : Discussion	54

Conclusion	58
Références bibliographiques	61
Annexes	

Introduction

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) constitue un problème majeur de santé publique. On estime que 257 millions de personnes vivent avec une infection chronique par le virus de l'hépatite B (définie comme la positivité pour l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs)). En 2015, 887 000 personnes sont décédées des suites d'une infection par l'hépatite B notamment de cirrhose ou de cancer du foie (**OMS, 2017**).

L'Afrique sub-saharienne constitue une zone de haute endémicité pour le VHB avec des prévalences de portage dépassant les 8% (**André F, 2000 ; WHO, 2000**). Selon le programme national de lutte contre les hépatites (**PNLH**) en 2014, le Sénégal présente une prévalence de porteurs de 11% et 85 % de la population sénégalaise ont au moins un marqueur du virus de l'hépatite B (**PNLH 2014**).

Le diagnostic de cette infection repose sur la détection de marqueurs sérologiques principalement l'AgHBs. Un portage de cet antigène au-delà de six (6) mois signe la chronicité de l'infection. Avec ce portage chronique un suivi biologique s'impose et est réalisé grâce au dosage des marqueurs sérologiques du VHB. Parmi ces marqueurs nous avons l'ADN viral dont la détection et la mesure constituent un des éléments clés de la prise en charge de l'hépatite chronique B (**Castera L., 2004**). Par ailleurs le dosage de l'ADN viral nécessite des plateformes de biologie moléculaire qui sont en nombre limité dans les pays à ressources limités où l'hépatite B est endémique.

Au Sénégal, certaines structures disposent de plateformes de biologie moléculaire permettant la détection et la quantification de l'ADN viral du VHB. Le principe de ces plateformes repose sur les techniques d'amplification de la cible (PCR ou *polymerase chain reaction*). Cependant le coût élevé pour la mise en place de ces techniques, le délai de réalisation des tests entre le prélèvement et le rendu des résultats dû au nombre d'échantillons exigés pour une série constituent des facteurs limitant pour le suivi. La technique de PCR en temps réel *Amplix NG 16® des laboratoires Biosynex* a été introduite récemment au Centre Médical Inter Armées (CMIA) et il est important de s'assurer de la fiabilité de cette technique avant son utilisation à large échelle afin de permettre une prise en charge clinique appropriée des patients.

C'est dans ce contexte que cette étude a été réalisée et avait pour objectifs :

- d'évaluer la méthode de RT PCR (*Amplix*®) utilisée au laboratoire du centre médical Inter Armées (CMIA) de Dakar et procéder ainsi à la validation technique ;
- de comparer les résultats des charges virales obtenus par *AmpliX*® (*HBV*) avec ceux obtenus avec *Cobas AmpliPrep*TM/*Cobas TaqMan*TM *HBV* considérée comme méthode de référence ;
- de faire une comparaison opérationnelle des 2 techniques.

Ce travail s'articulera autour des points suivants :

- une première partie dans laquelle nous ferons un rappel sur l'infection par le virus de l'hépatite B
- une seconde partie consacrée à la méthodologie, aux résultats obtenus qui seront discutés avec ceux de la littérature.



**Première partie : Revue
bibliographique**

1. Définition et historique de l'hépatite B

1.1. Définition

L'hépatite virale B est une infection du foie causée par le virus de l'hépatite B dont le réservoir est l'être humain (**Guide d'intervention sur l'hépatite B, 2014**). Elle se transmet à partir de sécrétions et liquides biologiques humains, notamment les sécrétions génitales, la salive et le sang provenant d'une personne infectée. Le virus se développe dans le foie des personnes infectées où il se reproduit en grande quantité. Les symptômes et les signes liés à l'infection par ce virus sont très variables suivant les formes. L'infection initiale passe très souvent inaperçue ; environ 50 à 80% des adultes infectés n'ont aucun symptôme mais ses manifestations cliniques peuvent être plus ou moins marquées (**Seeger et coll., 2007**): asthénie; anorexie ; nausées, vomissements ; douleurs abdominales ; légère fièvre, arthralgies, rash. À plus long terme, la gravité potentielle de l'hépatite B est constituée par le risque d'évolution vers une hépatite chronique B qui peut se compliquer d'une cirrhose du foie voire d'un cancer du foie (**Chang MH., 2007**)

1.2. Historique

Les hépatites ont été décrites dès le Moyen âge et leur importance était liée aux mauvaises conditions d'hygiène dans lesquelles vivait la population (**Bekondi C., 2008**).

La première épidémie enregistrée comme provoquée par le virus de l'hépatite B a été observée par Lurman en 1885. Durant cette période, à Brême (Allemagne), Lurman pratiquait des vaccinations contre la variole, utilisant un vaccin à base de lymphes humaine glycélinée. Après avoir vacciné 1289 ouvriers des chantiers navals, il put observer que 191 ouvriers développèrent une jaunisse dans une période allant de quelques semaines à 8 mois après la vaccination (**Lurman A., 1885**).

Bien que l'existence d'un virus ait été soupçonnée depuis les travaux de MacCallum en 1947 (**MacCallum., 1947**), le virus n'a été découvert qu'en 1963 quand Baruch Blumberg, un généticien travaillant au National Institutes of Health (NIH) aux États-Unis, a mis en évidence une réaction inhabituelle entre le sérum d'individus polytransfusés et celui d'un aborigène australien. Il pensa avoir découvert une nouvelle lipoprotéine dans la population autochtone qu'il désigna sous le nom d'antigène «Australia» (**Blumberg B.S. et coll., 1967**). En 1967, après plusieurs études, Blumberg publia un article montrant la relation entre cet antigène et l'hépatite. Le nom d'antigène HBs fut, par la suite, donné pour désigner cet antigène.

Il faudra cependant attendre 1970 pour que Dane et ses collaborateurs, grâce à la microscopie électronique, identifient des particules dans le sérum de trois malades atteints d'hépatite **(Dane D.S. et coll., 1970)**.

Au début des années 1980 le génome du virus a été séquencé **(Galibert F. et coll., 1979)** et les premiers vaccins ont été expérimentés **(Lancet, 1980)**. Le premier vaccin recombinant fut préparé par Pierre Tiollais et ses collaborateurs de l'Institut Pasteur, en 1985, à l'aide de cellules d'ovaires de hamster chinois **(Bazin H., 2008)**.

2. Taxonomie et structure du virus de l'hépatite B

2.1. Taxonomie

Le virus de l'hépatite B humain (VHB) appartient à la famille des *Hepadnaviridae*. Cette famille rassemble des petits virus sphériques, essentiellement hépatotropes, enveloppés, à ADN partiellement bicaténaire présentant une étroite spécificité d'hôte. **(Lucifora J., 2008)** Les virus appartenant à cette famille partagent aussi un cycle viral composé d'une étape de transcription inverse. La famille des *Hepadnaviridae* se scinde en deux genres différents selon l'espèce hôte du virus : les *Avihepadnavirus* qui infectent les oiseaux et les *Orthohepadnavirus* qui infectent les mammifères. Le représentant type du genre *Orthohepadnavirus* est le VHB. Celui-ci infecte l'homme **(Dane et coll., 1970)** mais aussi expérimentalement d'autres primates comme le chimpanzé **(Dienes et coll., 1990)**, le gibbon **(Lanford et coll., 2000)** ou encore ce petit mammifère proche des primates, le tupaia belangeri **(Walter et coll., 1996)**.

2.2. Structure du virus de l'hépatite B

2.2.1. Organisation structurale du virus

La particule virale infectante du virus de l'hépatite B (VHB) est de forme sphérique et d'un diamètre de 42-47nm **(Dane et coll. 1970)**. Elle est composée d'une enveloppe entourant une capsidie contenant elle-même une molécule d'ADN, une polymérase virale et des protéines cellulaires **(Kassab S., 2014)**.

L'enveloppe est une bicouche lipidique issue de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) lors du bourgeonnement de la particule virale dans la lumière des corps multi vésiculaires. Dans cette enveloppe sont insérés les trois types de protéines de surface du virus : la petite protéine S ou S-AgHBs, la protéine moyenne M ou M-AgHBs et la grande protéine L ou L-AgHBs **(Ganem D. et coll., 2001)**.

La nucléocapside de 27 nm environ est icosaédrique et formée par l'assemblage de 120 dimères d'une protéine nommée Core ou AgHBc.

Le génome du VHB contenu dans la nucléocapside est lié de manière covalente à la polymérase virale (**Dryden K.A. et coll., 2006**).

En plus des particules infectieuses, il existe des particules sub-virales sphériques (environ 20nm de diamètre) et filamenteuses (22nm de large pour une longueur variable) (**Gilbert et coll. 2005; Patient et coll. 2009**). Celles-ci sont dépourvues d'ADN viral et sont donc non infectieuses. Ces particules sub-virales sont composées d'une simple couche lipidique dans laquelle sont ancrées principalement les petites protéines d'enveloppe S (**Glebe D. et coll., 2007**) (figure 1)

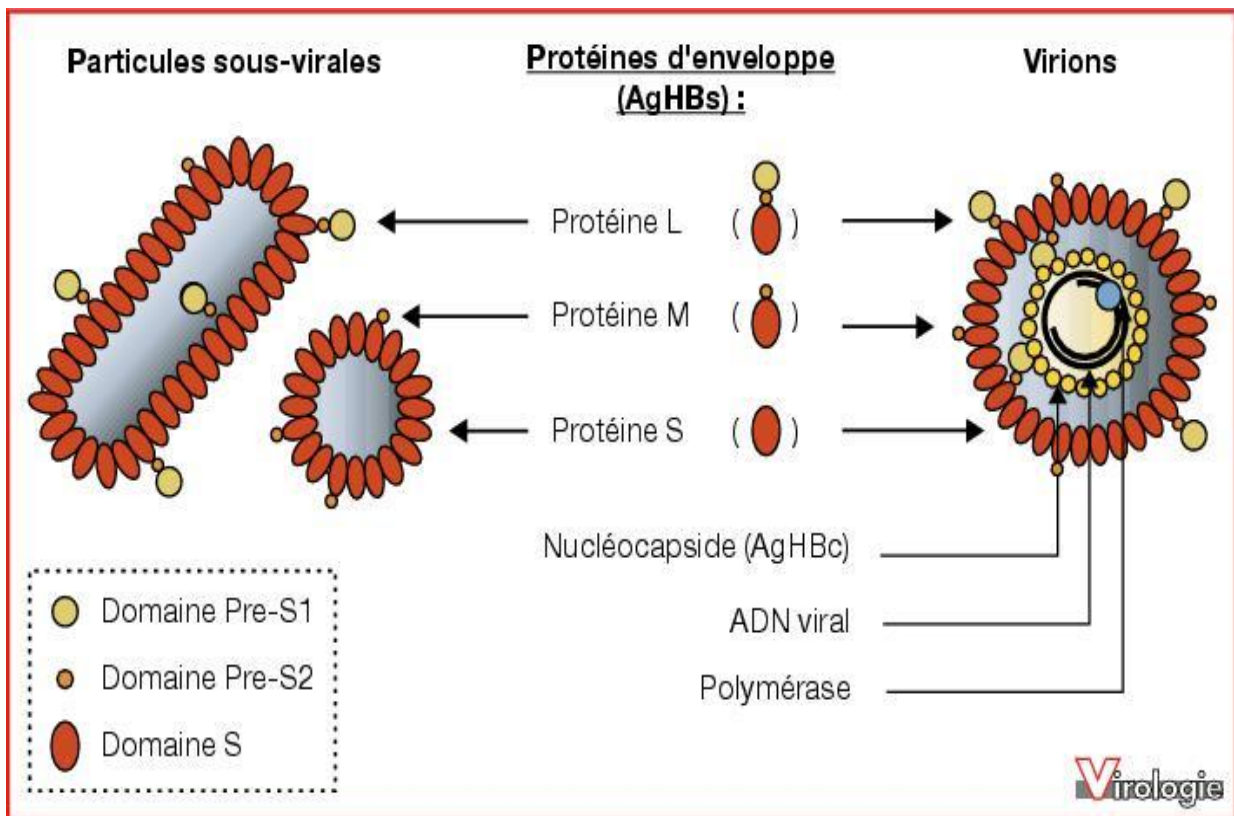


Figure 1: Différents types de particules virales du VHB (<http://www.jle.com>)

2.2.2. Organisation génomique du virus

Le génome viral contenu dans les particules de Dane est un ADN circulaire relâché de 3,2 kB, partiellement double brin appelé ADN-RC (**Lucifora J., 2008**) avec un brin long à polarité négative et un brin court à polarité positive (**Tiollais P. et coll., 1985**). C'est l'un des plus petits génomes jamais décrit et son organisation est assez complexe (**Seeger C., 2006**). Le brin de polarité négative (-) correspond au brin complet et transcrit ; il est relié de façon covalente à l'extrémité 5' à la polymérase virale grâce à la fonction hydroxyle d'un de ses résidus tyrosine. A l'inverse, le brin de polarité positive (+) correspond au brin incomplet qui comporte une extrémité de longueur variable en 3' (figure 2).

Le génome viral possède 4 cadres ouverts de lecture (ORFs pour « Open Reading Frame ») qui sont des séquences nucléotidiques permettant la transcription et la traduction du génome. Le brin négatif comporte quatre phases de lecture ouverte (ou ORF pour open reading frame) qui se chevauchent permettant ainsi au virus d'augmenter sa capacité codante. Il s'agit de l'ORF P, l'ORF PréS1/PréS2/S, l'ORF PréC/C et l'ORF X (**Servant-Delmas A. et coll., 2007**).

L'ORF PréS1/PréS2/S code les trois protéines de surface : l'AgHBs ou protéine majeure S (smallprotein : S), la protéine moyenne préS2 (medium protein : M) et la grande protéine préS1 (large protein : L) (**Mazet A.A., 2006**).

L'ORF PréC/C code pour deux protéines, la protéine précocure précurseur de l'antigène HBe et la protéine structurale de la capsid Core ou AgHBc.

Le gène P code l'ADN polymérase virale qui présente une activité ADN-polymérase, de transcription inverse et RNase H (**Maura Dandri et coll., 2013**) et aussi la fonction de protéine terminale (**Bartenschlager R. et coll., 1988**).

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 (**Zoulim et coll 2010**) et ayant une activité cancérogène.

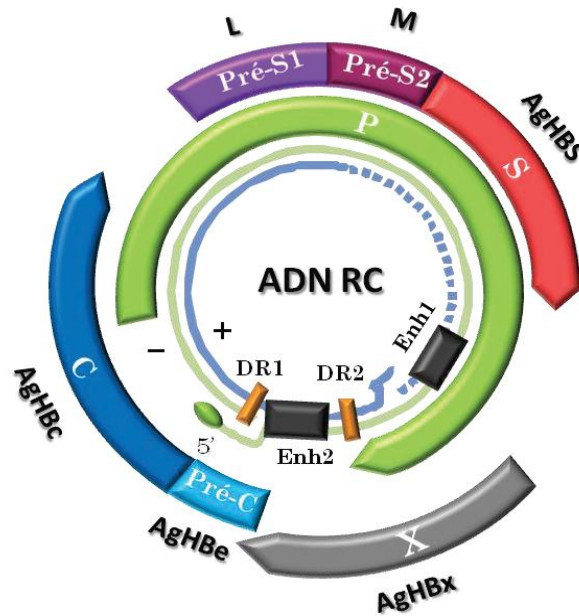


Figure 2: Organisation du génome du virus de l'hépatite B (Gruffaz M., 2013)

2.3. Les protéines virales

2.3.1. Les protéines d'enveloppe (ou de surface)

Les trois protéines d'enveloppe sont issues de la même phase ouverte de lecture, à partir de trois codons d'initiation différents, mais ont un codon stop commun. Les trois protéines S (AgHBs), M (PréS2), L (PréS1) partagent la même extrémité C-terminale hydrophobe et diffèrent en taille par leur extrémité N-terminale. Elles sont synthétisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique où elles sont directement insérées et peuvent subir plusieurs types de modifications post-traductionnelles.

- **La protéine S (ou AgHBs)**, de 226 acides aminés, est le composant majeur de l'enveloppe virale. Elle existe sous deux formes : une forme N-glycosylée et une forme non glycosylée. Elle est constituée exclusivement de la région S, commune aux trois protéines de surface.
- **La protéine M (ou préS2)** : Elle possède une topologie comparable à la protéine S. Elle comprend le domaine S additionné de 55 acides aminés à son extrémité N-terminale, correspondant à la région Pré-S2.
- **La protéine L (ou préS1)** : elle est composée des régions S, PréS2 et d'une partie variable allant de 100 à 120 aa correspondant à la région PréS1. La protéine L est indispensable à la formation des particules virales infectieuses ainsi qu'à la

reconnaissance des hépatocytes par le virus et à l'internalisation de celui-ci (**Le Duff et coll. 2009**).

Ces protéines sont particulièrement importantes car avec la membrane cellulaire hôte, elles forment l'enveloppe des particules virales. Elles sont exposées à la surface des virions et jouent un rôle déterminant dans les processus de reconnaissance cellulaire (attachement et entrée du virus dans l'hépatocyte et les interactions avec le système immunitaire).

2.3.2. Les protéines de core et précore

La protéine de core ou antigène HBc (AgHBc) est la protéine structurale de la capsid, elle est composée de 183 à 185 aa avec un poids de 22 kDa. Elle est synthétisée dans le cytosol des cellules infectées (**Chang C. et coll., 1994**). Elle est portée par la nucléocapside (**Schlicht H.J. et coll., 1987**) et n'est pas directement détectée dans le sérum car non soluble.

Elle est composée de deux régions principales :

- La région N-terminale (résidu 1 à 149 acides aminés) permet aux protéines de capsid d'interagir et de s'assembler en capsid icosaédrique. (**Belnap D M. et coll., 2003**).
- La région C-terminale (résidu 150 à 183 acides aminés) joue un rôle essentiel lors du cycle de réplication du virus en permettant dans un premier temps l'adressage de la capsid vers le noyau médié par un signal de localisation nucléaire (NLS) et dans un second temps l'encapsidation de l'ARN pré génomique et de la polymérase virale dans les capsides néoformées (**Stahl M. et coll., 2007**).

La protéine précore ou antigène HBe (AgHBe) est une protéine non structurale qui est sécrétée dans le sérum des personnes infectées. Dans un premier temps, la protéine PréCore (AgHBe) est synthétisée en tant que pro-protéine ; ensuite, le peptide signal induit le passage de la protéine naissante vers le réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion. Pendant la maturation, la pro-protéine est clivée à la fois en N-terminal dans le peptide signal et en C-terminal dans la queue basique, ce qui donne naissance à une protéine soluble de 17kDa nommée antigène HBe (**Nora M., 2012**). L'antigène HBe a été montré comme étant capable de moduler la réponse immunitaire contre le VHB. Ainsi, le taux de lymphocytes T régulateurs chez les patients VHB chroniques est corrélé à leur statut HBe (**Yang G et coll., 2007**), ce qui peut laisser supposer que l'antigène HBe serait capable de renforcer la polarisation des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs et ce qui aiderait le VHB à échapper à l'immunité de l'hôte.

2.3.3. La polymérase virale

Le gène *pol* est le plus grand gène du virus de l'hépatite B ; il chevauche entièrement l'ORF S mais aussi une partie des ORFs C et X. La polymérase virale est une protéine d'environ 850 acides aminés (aa) qui possède les activités: polymérase ARN-dépendante (reverse transcriptase), polymérase ADN-dépendante (réplication) et RNase H (dégradation de l'ARN) **(Radziwill, et coll. 1990)**.

Quatre domaines ont été définis pour la polymérase virale **(Seeger C., 2006)**:

- Un domaine TP responsable de l'attachement covalent de la polymérase à l'extrémité 5' du brin (-) de l'ADN du VHB grâce à une liaison phospho diester entre une tyrosine en position 96 et le premier nucléotide du brin d'ADN (-) naissant ;
- Un domaine «espaceur» qui assure la flexibilité de la protéine et dont la séquence peut tolérer de nombreuses mutations ;
- Un domaine responsable de l'activité ADN polymérase ARN dépendante (pour la transcription inverse de l'ARN pré-génomique ou ARNpg) en brin d'ADN (-), et ADN polymérase ADN dépendante pour la synthèse du brin (+) à partir du brin (-) dont le site catalytique contient un motif YMDD.
- Un domaine RNase H qui grâce à son activité ribonucléasique est responsable de la dégradation de l'ARNpg lors de la synthèse du brin d'ADN (-).

2.3.4. La protéine X

Codée par l'ORF X, la protéine X ou AgHBx est la plus petite protéine virale du VHB avec une taille de 17KDa (154 acides aminés) **(Miller et coll., 1986)**. L'AgHBx est une protéine non structurale qui possède de multiples activités transactivatrices virales et cellulaires **(Kew 2011; Fallot et coll. 2012; Andrisani 2013)**. Selon certaines études, il semblerait que la protéine X soit prédominante dans le compartiment nucléaire lorsqu'elle est exprimée en faible quantité, puis qu'elle s'accumule dans le cytoplasme quand sa concentration augmente **(Cha et coll. 2009)**. Cette protéine ne semble pas interagir directement avec l'ADN, mais plutôt agir via l'activation d'autres facteurs de transcription **(Block T M. et coll., 2003)** et affiche des effets pléiotropes sur les différentes voies impliquées dans la signalisation intracellulaire **(Kew 2011)**. Le rôle pathogénétique de la protéine virale HBx dans la survenue du carcinome hépatocellulaire (CHC) est soutenu en grande partie comme une preuve des mécanismes directs par lesquels le VHB provoque une transformation maligne. En effet plusieurs études ont démontré l'expression de l'ARNm HBx et/ou de la protéine dans le CHC humain en l'absence de toute réplication du VHB **(Toh et coll. , 2013)**.

2.3.5. L'Hépatite B Spliced Protein

Une protéine du virus de l'hépatite B, l'Hépatite B Spliced Protein (HBSP), a été mise en évidence *in vivo* tardivement. Elle est codée par l'un des ARN issu de l'épissage de l'ARNpg (**Soussan P. et coll. 2000**). *In vitro*, l'expression de la protéine HBSP ne module pas la réplication virale, mais diminue la viabilité cellulaire par apoptose. *In vivo*, sa détection semble corrélée à la réplication virale et à la sévérité de la maladie au cours de l'histoire naturelle de l'infection (**Pol J. et coll., 2005 ; Dienstag J.L., 2008**).

3. Cycle de réplication du VHB

La principale originalité du VHB réside dans le fait que ce virus à ADN subit une étape de rétro transcription pour répliquer son génome comme les rétrovirus. Cependant, contrairement à ces derniers, le génome du VHB n'est pas obligatoirement intégré dans le génome de la cellule infectée (**Billioud G. et coll., 2010**). Le cycle de réplication du VHB se déroule en 7 étapes et est représenté dans la figure 3.

La première étape est constituée par l'attachement de la particule infectieuse à une structure exposée accessible à la surface des hépatocytes de l'hôte. Après interaction avec la membrane, le virus pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose pH indépendant (**Kock et coll. 1996**) suivie par la libération des nucléocapsides à partir de vésicules d'endocytose.

Les nucléocapsides, relarguées dans le cytoplasme des hépatocytes, empruntent le réseau de microtubules (MT) pour atteindre le centre organisateur des microtubules ou microtubule organizing center (MOTC) à proximité du noyau et des pores nucléaires (**Kann M. et coll., 2007**). Les nucléocapsides du VHB se désassemblent en dimères d'AgHBc à l'intérieur du pore nucléaire et libèrent le génome viral dans le noyau cellulaire (**Rabe B. et coll., 2009**). Dans ce dernier, l'ADN-RC est converti en un ADN circulaire covalent clos superenroulé nommé ADNccc. Ce dernier s'accumule dans le noyau et prend la forme d'un mini chromosome viral qui sert de matrice pour la transcription des gènes viraux (**Bock C.T. et coll., 2001; Newbold J.E. et coll., 1995 ; J. Köck et coll., 1993, S. Urban et coll., 2010**).

Dans la majorité des cas, ces ARN viraux ne sont pas épissés. Ils sont exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines. L'encapsidation s'effectue dans le cytoplasme et est permis par un signal d'encapsidation appelé epsilon présent à l'extrémité 5' de l'ARN pré-génomique excluant ainsi les ARNm viraux et cellulaires. La synthèse de suffisamment de protéines HBc et d'au moins une molécule de polymérase initie à la fois l'encapsidation du complexe ARNpg-polymérase et la transcription inverse de l'ARNpg (**Pollack J R. et coll.,**

1993 ; Wang G H. et coll., 1994 ; Datta S. et coll., 2012). Cette dernière se passe uniquement dans le lumen de la capside (Summers J. et coll., 1982).

L'ARNpg, par l'intermédiaire du signal d'encapsidation, sert de matrice à l'étape de reverse transcription et interagit avec la polymérase virale. L'élongation du brin d'ADN (-) continue après la synthèse d'une séquence de 3-4 nucléotides et translocation du complexe polymérase – oligonucléotide au niveau de la région complémentaire DR1 en 3' de l'ARNpg. L'activité RNase H de la polymérase virale entraîne la dégradation l'ARNpg et un morceau de 20 nucléotides de long est épargné (Nassal M., 2008 ; Weber M. et coll., 1994) ; ce morceau devra servir d'amorce à la polymérase virale pour la synthèse partielle du brin d'ADN de polarité positive (Datta S. et coll., 2012).

La dernière étape du cycle viral est la sécrétion des particules virales qui est favorisée par une certaine concentration en protéines de surface. Les particules virales enveloppées sont ensuite excrétées par exocytose sous forme de virions infectieux qui pourront alors infecter de nouveaux hépatocytes (Ganem D. et coll., 2004). Parallèlement à la synthèse de nouveaux virions, un grand nombre de particules sous-virales vides composées essentiellement des protéines S et de lipides cellulaires sont produites (Datta S. et coll., 2012).

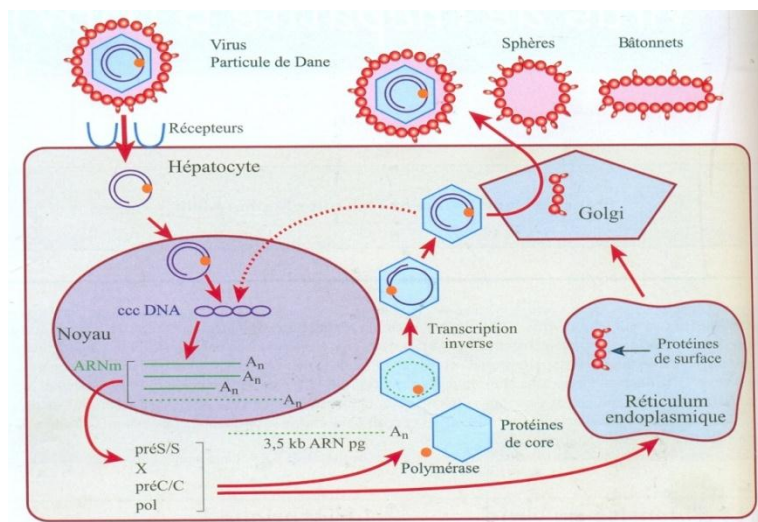


Figure 3: Cycle réplcatif du virus de l'hépatite B (Zoulim F. et coll., 1997)

4. La variabilité génomique du virus de l'hépatite B

Les souches virales sont classées en génotypes et en sous-types en fonction du pourcentage d'homologie nucléotidique sur l'ensemble du génome. La variabilité génomique du VHB est le résultat du grand nombre d'erreurs générées lors de l'étape de reverse transcription, du fort taux de réplication virale et des processus d'adaptation hôte virus (Martel N., 2012). Ainsi, chez un même individu vont coexister des populations virales sauvages et mutées qui pourront co-évoluer tout au long de l'histoire naturelle de l'infection (Ducancelle A. et coll., 2011). La variabilité génétique du VHB s'observe sur toutes les régions du génome viral.

4.1. Mutations ponctuelles

La mutation la plus fréquemment décrite dans la région précore (PC) du VHB est la mutation G1896A qui induit la formation d'un codon stop au niveau du 28^e codon et abolit ainsi la synthèse de l'antigène HBe (Ducancelle A. et coll., 2011) ; **cette mutation conduit à la séroconversion HBe et est un signe de gravité de l'hépatite virale B.**

Dans la région du promoteur basal du core (PBC), la double mutation (A1762T-G1764A) est associée à une baisse de la synthèse de l'antigène HBe (Ducancelle A. et coll., 2011).

Le gène de la polymérase du fait de sa longueur est soumis à des variations importantes et souvent une mutation retentit à la fois sur la polymérase et sur les gènes chevauchants. Une mutation au site actif peut entraîner une résistance à un antiviral tout en conservant la capacité répliquative. Par exemple la modification du motif YMDD en YVDD ou YIDD entraîne une apparition d'une résistance à la lamivudine (Thibault V. et coll., 1999).

Dans le gène *préS/S*, les substitutions dans le déterminant *a* de l'AgHBs sont susceptibles d'induire un changement des propriétés physicochimiques, entraînant une modification de liaison aux Ac. La variation la plus fréquente est le remplacement de la glycine (G) en position 145 par une arginine (R) (Fujii H. et coll., 1992), ce qui abolit la spécificité antigénique de la protéine S. Egalement dans ce gène *préS/S* de nombreuses délétions ont été décrites au niveau des protéines de surface des domaines préS1 et préS2 (Kao J-H. et coll., 2012). Les délétions dans les domaines préS semblent plus fréquemment associées au développement d'un CHC. Leurs implications physiopathologiques ne sont pas claires. Néanmoins, les délétions présentes dans le domaine préS2 sont les plus fréquentes et incluent des épitopes B et T suggérant un échappement immunologique. Cependant la plupart des délétions préS1 génèrent des virus défectifs qui nécessitent un virus sauvage en co-infection cellulaire pour compenser les pertes de fonction (Kassab S., 2014).

Les études de mutations ponctuelles sur la protéine X ont montré que cette dernière interagit avec plusieurs systèmes de signalisation intracellulaire (activation de NF- κ B par exemple) et possède un rôle anti-apoptotique. La comparaison des séquences de virus circulant chez des patients ayant un CHC ou une hépatite chronique montre une accumulation de mutations en cas de CHC (**Venard V. et coll., 2000**).

4.2.Sérotypes

Bien avant la classification en géotypes, très rapidement après la découverte du virus, différents sous types ont été identifiés dans le sérum des patients, permettant le classement des virus en quatre sérotypes *adr*, *adw*, *ayw* et *ayr*, correspondant à la combinaison des différents déterminants antigéniques. Sur tous les virus, le déterminant antigénique *a* est présent au niveau de la boucle antigénique entre les acides aminés 124 et 147 de la petite protéine de surface (S). La différence entre les déterminants exclusifs *d/y* et *w/r*, elle résulte respectivement de la substitution d'une lysine (K) en une arginine (R) à la position 122 ou 160. La découverte de déterminants additionnels a permis l'identification de quatre sous types différents pour *ayw* (*ayw1*, *ayw2*, *ayw3* et *ayw4*) et de deux pour *adw* (*adw2* et *adw4*) (**Lepère-Douard C. ,2009**).

4.3.Géotypes

L'accumulation des mutations, la sélection des variants les mieux adaptés à l'environnement et leur transmission au sein de zones géographiques ou ethniques délimitées a conduit à la divergence progressive au cours du temps de différents types « sauvages » de VHB. Ces variants sont stables et reflètent l'évolution du VHB. La comparaison des génomes de plusieurs souches a permis de regrouper huit géotypes principaux qui ont été décrits et désignés par les lettres allant de A à H. A l'exception des géotypes E, G et H tous les géotypes sont divisés en sous-géotypes. Un sous-géotype est caractérisé par une divergence nucléotidique comprise entre 4 et 8 % mais aussi par un motif d'acide aminé qui lui est propre (**Norder H et coll. 2004; Kramvis et coll. 2008**). La distribution géographique des géotypes du VHB n'est pas homogène et reflète les mouvements de population : le géotype **A** est dominant en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord. Les géotypes **B** et **C** sont surtout présents en Asie et le géotype **E**, en Afrique. Le géotype **D** est retrouvé sur tous les continents, avec une plus forte prévalence dans le Sud de l'Europe et le Moyen-Orient. La localisation du géotype **F** est limitée à l'Amérique Centrale et Amérique du Sud. Des cas isolés d'infections dues au géotype **G** ont été décrits en France, en Allemagne et aux

USA. Le génotype **H**, qui pourrait dériver du génotype **F**, a été identifié en Amérique Centrale (Schaefer S. ,2005 ; Zeng G. et coll., 2005) (Figure 4).

Au Sénégal, une étude réalisée en 2006 a démontré la prédominance du génotype **E** dans la population sénégalaise, mais également l'importance du génotype **A** surtout chez des sujets plus jeunes (Vray M. et coll., 2006). Toujours au Sénégal, une étude menée dans le cadre du projet PROLIFICA (projet de la prévention de la fibrose hépatique et du cancer en Afrique de l'Ouest) a démontré une prédominance du génotype **E** soit **70%** de la population d'étude (DIOP F., 2018)

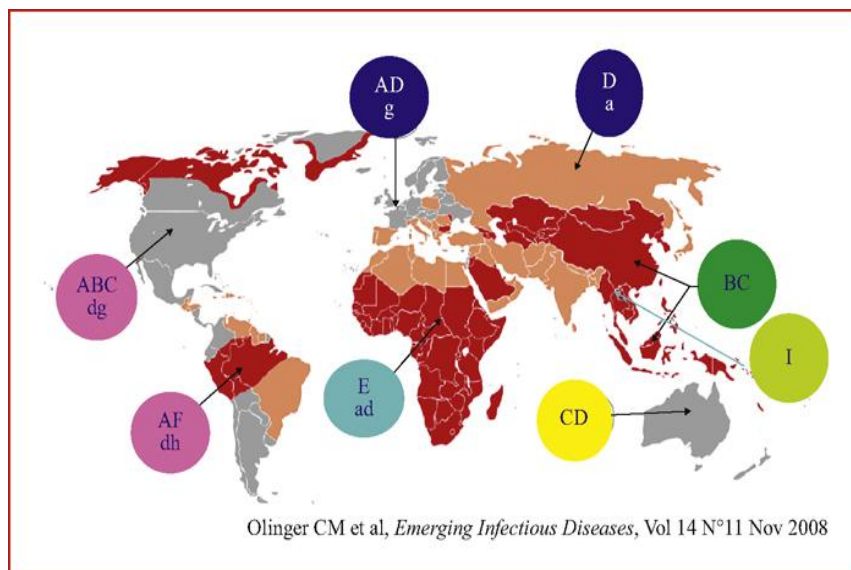


Figure 4: Répartition géographique des différents génotypes du virus de l'hépatite B (Olinger C.M. et coll., 2008).

L'impact du génotype sur l'évolution de l'infection est controversé. Il a souvent été tenté d'associer un génotype particulier du VHB avec des formes sévères d'hépatites et au développement de CHC mais les résultats sont contradictoires et ne peuvent se satisfaire uniquement du génotype de la souche virale sans prendre en compte des facteurs biologiques, environnementaux et viraux pouvant influencer l'évolution de la maladie hépatique (Martel N. 2012, Zoulim F. et coll., 1997). La correspondance entre les génotypes et les sérotypes ainsi que leurs différences génomiques est indiquée dans le tableau I. Les sous-types entre parenthèses sont rarement observés dans le génotype correspondant (Kidd-Ljunggren K. et coll., 2002 ; Weber B. ,2005)

Tableau I: Correspondances entre les génotypes et les sérotypes du VHB et présentation des différences génétiques principales entre les génotypes (Schaefer S. ,2005; Schaefer S. ,2007).

GENOTYPES/SEROTYPES			
Génotype	Sérotype prédominant	Différence dans les ORF	Localisation géographique
A	Adw2 (ayw1)	Insertion des acides aminés 153 et 154 dans l'antigène de capsid (HBc)	Europe de l'Ouest, États-Unis, Afrique centrale, Inde
B	Adw2 (ayw1)		Indonésie, Chine, Vietnam
C	Adr et ayr		Asie de l'Est, Chine, Japon, Polynésie, Vietnam, États-Unis, Australie
D	Ayw1, 2 et 3	Délétion des acides aminés 1 à 11 du domaine Pre-S1.	Bassin méditerranéen, Moyen-Orient, Inde, Russie, États-Unis
E	Ayw4 (adw 2)	Délétion de l'acide aminé 11 du domaine Pre-S1	Afrique subsaharienne
F	Adw4		Amérique centrale, Amérique du sud, Polynésie, États-Unis
G	Adw2	Insertion de 12 acides aminés dans l'antigène HBc. Délétion de l'acide aminé 11 du domaine Pre-S1	Europe, États-Unis
H	Adw4		Amérique centrale, Amérique du sud

5. Epidémiologie de l'infection par le virus de l'hépatite B

L'infection par le virus de l'hépatite B représente un problème de santé publique à l'échelle mondiale de par sa fréquence, ses complications et ses répercussions socio-économiques. Le nombre de personnes estimé vivant avec une infection par le virus de l'hépatite B (définie comme la positivité pour l'antigène de surface de l'hépatite B) est de 257 millions. En 2015, 887 000 personnes sont décédées des suites d'une infection par l'hépatite B notamment de cirrhose ou de cancer du foie (**OMS 2017**). L'OMS, dans son rapport de 2008, précise que ce virus, est très contagieux : « 50 à 100 fois plus infectieux que le VIH ». Le risque de contamination par le VHB à la suite d'une exposition au sang est 10 fois supérieur à celui du virus de l'hépatite C (**OMS, 2008**). Le VHB est la dixième cause de mortalité dans le monde ;

il est le second carcinogène après le tabac et est responsable de 80% des cas de cancer du foie (OMS., 2013) qui en Afrique, est la 2ème cause de cancer chez l'homme et la troisième cause chez la femme (Pierre P et coll., 2017).

5.1. Modes de transmission

L'infectiosité du VHB s'explique par sa présence et sa concentration élevée dans la plupart des liquides biologiques des personnes infectées : 10^8 à 10^9 virions par millilitre dans le sang, 10^6 à 10^7 /mL dans le sperme et les sécrétions vaginales, 10^5 à 10^7 /mL dans la salive (Antona D. et coll., 2010). Les quatre (4) principaux modes de contamination par le VHB sont : la transmission parentérale, la transmission sexuelle, la transmission verticale (périnatale ou materno-fœtale) et la transmission horizontale.

5.1.1. La transmission parentérale

La transmission parentérale est principalement représentée par la transfusion sanguine (mais le taux de sujets infectés suite à une transfusion est en baisse grâce au dépistage de l'Ag HBs chez les donneurs dans la plupart des pays), les accidents d'exposition au sang des professionnels de la santé, l'utilisation de matériel non stérile pour le tatouage, les piercings, l'acupuncture et la toxicomanie par voie veineuse. Les toxicomanes restent la population la plus concernée par ce mode de transmission dans les pays occidentaux. Au Sénégal dans la région de Dakar, la prévalence du VHB a été estimée dans la population d'usagers précaires de drogues injectables à 7,9% (Leprêtre A. et coll., 2015).

5.1.2. La transmission sexuelle

La transmission sexuelle (par le sperme ou les sécrétions vaginales) est une source majeure d'infection par le VHB dans tous les pays du monde. Cette transmission est importante chez les homosexuels mais elle est également très fréquente par voie hétérosexuelle, aussi bien dans le sens homme-femme que femme-homme. L'hépatite B est considérée comme une maladie infectieuse extrêmement contagieuse. En Afrique subsaharienne la transmission sexuelle est favorisée par les comportements à risque (multi partenariat sexuel, polygamie, homosexualité masculine) (Kodjoh N., 2014). Dans les pays occidentaux, l'infection virale n'est pas endémique et se transmet principalement par les rapports sexuels (INVS. ,2007 ; Liaw Y.F. et coll., 2009).

5.1.3. La transmission verticale (périnatale ou materno-fœtale)

La transmission mère-enfant est un facteur très important de dissémination du VHB dans les régions de forte endémie comme l'Asie du Sud-est et l'Afrique sub-saharienne. La prévalence de la transmission mère-enfant est élevée en Afrique au sud du Sahara, de 20 à 43,2 % selon les études (Kodjoh N., 2014). La transmission périnatale inclut la période *in utero*, l'accouchement, le *post-partum* et la première enfance (Gallagher K.M. et coll., 2008). Cette transmission est exceptionnelle *in utero* et survient surtout par le sang maternel lors de la traversée de la filière génitale au cours de l'accouchement. Elle est rarement secondaire à une hépatite aiguë du troisième semestre de la grossesse mais surtout due à un portage chronique chez la mère. Chez les mères ayant une charge virale élevée le risque de transmission est de 85% à 90%. Ce risque diminue d'autant plus que la charge virale est basse (Boesecke C. et coll., 2013).

5.1.4. La transmission horizontale

Elle est encore appelée transmission « sous le toit ». La transmission horizontale survient au sein des familles et des collectivités d'enfants (Boesecke C. et coll., 2013). La transmission horizontale du VHB est importante étant donné le taux élevé du virus au niveau des plaies et de la salive chez un sujet infecté (Bekondi C., 2008). Le virus peut être transmis par contact avec la salive à la suite des morsures ou d'autres effractions cutanées. Bien que la réalité de ce mode de contamination lié à la salive soit difficile à évaluer, ce liquide biologique semble être un mode possible de transmission permettant de rendre compte des cas rapportés de transmission d'hépatite B, lors de contacts interhumains étroits et fréquents (CSHPF., 2005). La fréquence de plaies et des excoriations cutanées avec exsudats au niveau des membres inférieurs ont été évoquées comme facteurs favorisants. De même, ont été évoquées les lésions telles des ulcérations ou abrasions buccales, ainsi que les expositions répétées directes ou par l'intermédiaire d'effets personnels (brosse à dents, rasoir, etc.) (Davis L.G. et coll., 1989 ; Guide des vaccinations, 2003).

5.2. La répartition géographique de l'hépatite B

La répartition mondiale de l'infection au VHB est très hétérogène et varie selon les régions. Trois grandes zones d'endémie sont différenciées en fonction du niveau de prévalence du portage de l'Ag HBs, correspondant à des modes de transmission et des niveaux de risque différents (voir figure 5).

5.2.1. Zones de forte endémie

Dans les états membres de l'OMS du Pacifique occidental et de l'Afrique, la prévalence de l'AgHBs chez la population adulte est égale ou supérieure à 6 % (OMS., 2017) et à 8 % dans la population générale. Dans ces zones de forte endémie le risque d'acquérir l'infection au cours d'une vie entière est supérieur à 60 %. La majorité des infections sont acquises à la naissance ou au cours des premières années de vie (Antona D., 2010).

5.2.2. Zones d'endémie intermédiaire

Les zones d'endémie intermédiaire, où la prévalence de l'Ag HBs est comprise entre 2 et 8 %, regroupent les pays du Proche-Orient, d'Amérique Centrale et du Sud, l'Asie Centrale, le sous-continent indien et certains pays de l'Europe du Sud et de l'Est, soit 43 % de la population mondiale. Dans cette zone, le risque d'acquérir l'infection au cours d'une vie entière est compris entre 20 et 60%, et la contamination survient à tous les âges de la vie (Antona D. et coll., 2010).

5.2.3. Zones de faible endémie

Les zones de faible endémie avec une prévalence de l'Ag HBs inférieure à 2 % incluent essentiellement les pays industrialisés (Europe de l'Ouest et du Nord, Amérique du Nord, Australie). Ces zones représentent 12 % de la population mondiale. Le risque d'acquérir l'infection au cours d'une vie entière est inférieur à 20 %, et la contamination survient surtout à l'âge adulte (Mast E. et coll., 2004).

En Afrique, plus de 65 millions de personnes sont des porteurs chroniques du VHB. On y distingue deux zones de prévalence différentes : l'Afrique du nord, avec une prévalence de 2 à 7 % et l'Afrique sub-saharienne avec une prévalence comprise entre 8 et 18 % de la population générale (Konaté A., 2012).

Au Sénégal, 85 % de la population sénégalaise présentent au moins un marqueur du virus de l'hépatite B (Sall Diallo A. et coll., 2004 ; Modi AA. et coll., 2007). Après une infection aiguë, 20 % deviennent des porteurs chroniques. Selon le Ministère de la Santé au Sénégal en 2012, 11% de la population étaient des porteurs chroniques (<http://hepatitesafrique.org/>).

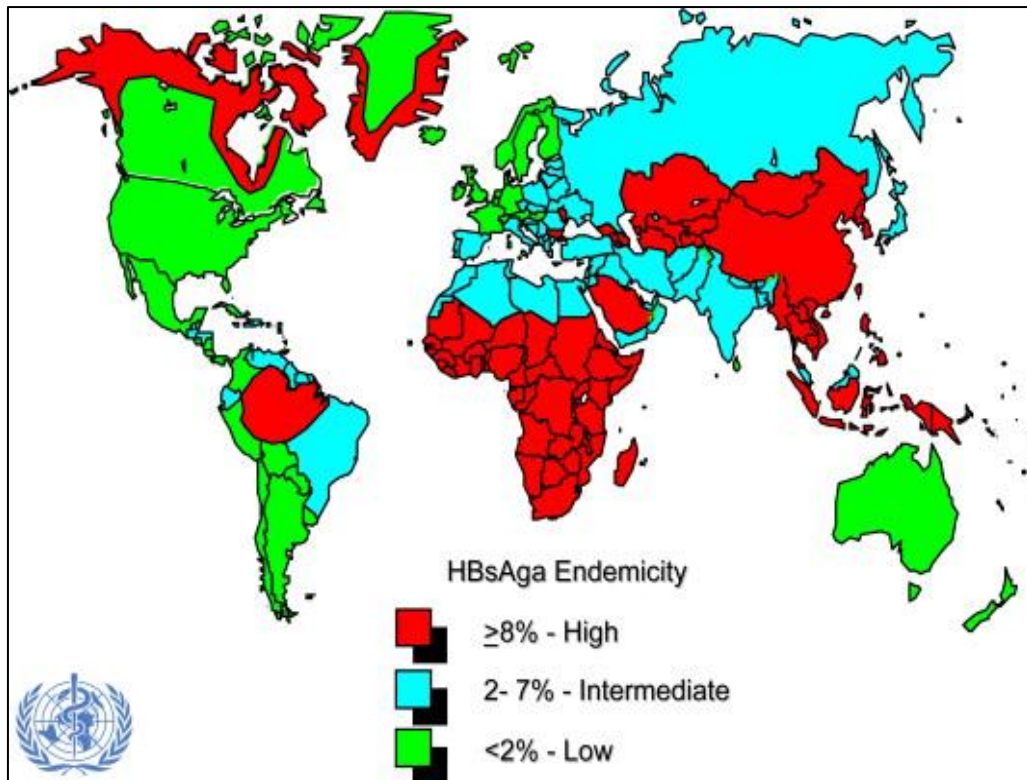


Figure 5: Répartition mondiale de la prévalence du portage de l'AgHBs (OMS. ,2012).

6. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B

L'histoire naturelle de l'infection par le VHB est complexe et varie selon les zones d'endémie. Elle est influencée par l'âge au moment de l'infection, le niveau de réplication virale et le statut immunitaire de l'hôte (**Fattovich G. ,2003**). La résolution de l'hépatite B se produit dans 20-50% chez les petits enfants, alors qu'elle ne se produit que dans 10% des cas lorsque l'infection aiguë est périnatale (**Pol S. ,2005**). Chez plus de 90% des adultes, l'infection se résout par elle-même tandis que chez 1 à 3% des adultes un portage chronique s'initie (**WGO., 2008. Asabe S. et coll., 2009**). En effet celle-ci persiste chez près de 90% des nourrissons infectés à la naissance, chez 20 à 50% des enfants infectés avant leurs 5 ans, chez 6% de ceux infectés entre 5 et 15 ans (**WGO., 2008**). Cette évolution de la maladie semble imputable à la faiblesse du système immunitaire chez les jeunes enfants et chez certains adultes.

L'histoire naturelle de l'hépatite B chronique est un processus dynamique et complexe qui présente une évolution variable dépendant de la balance entre les paramètres viraux et la réponse immunitaire de l'hôte (**Ganem D. et coll., 2004**). Elle est schématiquement divisée

en plusieurs phases qui ne se succèdent pas forcément : la phase de tolérance immunitaire, la phase de clairance immunitaire, la phase de portage inactif, la phase de réactivation de l'hépatite B et la phase de contrôle immunitaire (**Lunel-Fabiani F. et coll., 2012**).

- **La phase de tolérance immunitaire** est caractérisée par la positivité de l'AgHBe, un taux élevé d'ADN du VHB supérieur à 10^9 UI/mL dans le sérum, un taux normal ou peu augmenté d'ALAT et des lésions histologiques d'activité nécrotico-inflammatoire et de fibroses absentes ou minimales.
- **La phase d'activité immunitaire** est associée à une positivité de l'AgHBe et à une réplication modérée du VHB (ADN du VHB > 2000 UI/mL). Cette phase, qui peut durer quelques mois à plusieurs années, est caractérisée par une augmentation ou des valeurs fluctuantes d'ALAT et par la présence de lésions nécro-inflammatoires hépatiques modérées à sévères et une fibrose hépatique qui peut évoluer vers la cirrhose (dans 10 à 20 % des cas).
- La troisième phase est celle du **portage inactif du VHB**. Elle est caractérisée par une négativation de l'AgHBe et la présence de l'anticorps anti-HBe associées à un taux sérique d'ADN du VHB indétectable ou faible (ADN du VHB < 2 000 UI/mL) et à des valeurs de l'ALAT normales. À ce stade, les lésions histologiques sont absentes. Cette phase résulte d'un contrôle immunologique de l'infection.
- **La phase d'hépatite chronique à AgHBe négatif** peut suivre la phase d'activité immunitaire en cas de séroconversion HBe. Elle représente une phase plus tardive dans l'histoire naturelle de l'hépatite chronique B. Elle est caractérisée par une réplication virale et des valeurs d'ALAT fluctuantes. Les malades sont AgHBe négatifs et sont infectés par des virus mutants qui portent des substitutions nucléotidiques dans la région précore et dans la région promotrice du core.
- **La phase de réactivation :**
Par ailleurs, en l'absence de clairance de l'AgHBs, une phase de réactivation avec les mêmes caractéristiques sériques (AgHBe ou anticorps anti-HBe) associée à des taux fluctuants d'ADN du VHB et d'ALAT, et un risque d'aggravation de la fibrose peut être observée. Ces épisodes de réactivation virale peuvent être spontanés ou favorisés par un état d'immunosuppression. Cette cinquième phase est observée chez 20 à 30 % des malades (**Hézode C., 2011**).

6.1. Pathogénèse

L'infection par le virus de l'hépatite B est à l'origine d'atteintes hépatiques aiguës ou chroniques qui peuvent évoluer vers la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (CHC). Le virus n'est pas directement cytopathogène : c'est la réponse immune qui induit les lésions hépatiques chez les patients (**Hollinger J.B. et coll., 2001**). La réponse des cellules T spécifiques du virus est un des éléments clés de la pathogénèse de l'infection du VHB (**WGO., 2008**). Cette réponse implique aussi bien le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II avec les lymphocytes T CD4+ auxiliaires que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I avec les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. L'activité antivirale des lymphocytes T CD8+ est dirigée contre plusieurs épitopes portés par la protéine core, la polymérase et les protéines d'enveloppe. Une forte réponse des lymphocytes T CD4+ contre la protéine core et la polymérase a aussi été observée dans le sang périphérique (**Ganem D. et coll., 2004**). Contrairement aux infections aiguës, les porteurs chroniques du VHB ont une réponse immune virus-lymphocytes T spécifique fortement atténuée (**Ganem D. et coll., 2004**).

Des cofacteurs de carcinogénèse ont également été parfaitement identifiés avec, notamment, la consommation d'alcool, l'exposition à l'aflatoxine induisant des mutations dans le gène suppresseur de tumeur p53, la co-infection avec le virus de l'hépatite C, le tabagisme etc... (**Zoulim F. et coll., 2005**).

6.2. Symptomatologie

6.2.1. L'hépatite B aiguë

Environ 85 % des infections aiguës sont asymptomatiques et la fréquence des formes symptomatiques augmente avec l'âge au moment de la contamination. En effet l'infection aiguë est généralement asymptomatique chez les nouveaux nés et les enfants alors qu'elle entraîne une hépatite aiguë ictérique dans 30 à 50% des cas chez les sujets adultes (**Fattovich G., 2003**).

Le tableau clinique habituel comporte schématiquement trois phases :

- **la phase d'incubation** qui est de 75 jours en moyenne, mais peut varier de 30 à 180 jours
- **la phase pré-ictérique**, peu spécifique, inconstamment marquée par une asthénie, un syndrome pseudo grippal, des troubles digestifs modérés, une éruption cutanée inconstante;

- **la phase ictérique**, associant ictère, hépatomégalie dans 50 % des cas et splénomégalie dans 25 % des cas. L'ictère survient 1 à 2 semaines après le contagage et persiste 2 à 3 semaines.

Dans tous les cas, la phase aiguë est marquée par une élévation nette du taux de transaminases. Dans 90 % des cas chez les adultes, la réponse immunitaire de l'hôte, vigoureuse et efficace, permet la résolution de l'infection, avec disparition des signes cliniques (l'asthénie peut cependant persister plusieurs semaines) et normalisation des transaminases.

On estime que 1 % des hépatites aiguës B symptomatiques vont évoluer vers une hépatite fulminante. Cette forme grave, avec une réponse immunitaire excessive de l'hôte et une destruction massive des hépatocytes, conduit au décès dans 80 % des cas en l'absence de greffe hépatique. L'hépatite fulminante se manifeste par des signes d'insuffisance hépatocellulaire avec risque d'encéphalopathie mortelle. Elle est rare (0,1% à 0,5% des cas). La co-infection aiguë VHB avec le virus de l'hépatite D (VHD) a tendance à être plus sévère que l'infection à VHB aiguë, avec un risque accru de survenue d'hépatite fulminante (**Boesecke C. coll., 2013**).

6.2.2. L'hépatite B chronique

Le passage à la chronicité est défini par la persistance de l'AgHBs au-delà de 6 mois. Les mécanismes impliqués dans l'établissement de la chronicité sont multiples et dépendent de l'âge de primo infection, de la maturité du système immunitaire et de la souche virale impliquée (virus sauvage ou muté). Il a été montré que la réponse cellulaire, intense dans l'hépatite B aiguë, est déficiente ou quasi indétectable au cours des hépatites B chroniques (**Sobao Y. et coll., 2002**). En Afrique, on est le plus souvent confronté soit à la découverte du portage du virus lors d'un bilan ou le plus souvent au stade des complications de l'hépatite chronique B que sont la cirrhose et le cancer du foie (**Lunel-Fabiani F. et coll., 2012**). L'examen clinique est normal le plus souvent. En cas de lésions hépatiques évoluées, on peut retrouver une splénomégalie, une gynécomastie, une atrophie testiculaire, une érythrose palmaire, angiome stellaire, etc. En cas de cirrhose décompensée, l'ictère, l'ascite, les œdèmes périphériques et l'encéphalopathie peuvent être retrouvés (**Wasley A., 2008**).

6.2.3. Le virus de l'hépatite B et le cancer du foie

Le virus de l'hépatite B (VHB) est incriminé comme cause de cancer primitif du foie. En effet, il est admis que le VHB serait responsable de 55% de CHC au niveau mondial et de 89% de CHC dans les pays endémiques (**Kew MC et coll., 2010**). Chez l'adulte, il est à l'origine

d'hépatites aiguës, parfois fulminantes, mais aussi de formes chroniques pouvant évoluer vers la cirrhose (20% des hépatites chroniques) et le cancer du foie ou carcinome hépatocellulaire (**Chemin I. et coll., 2009**). Il arrive que le VHB induise un carcinome sans cirrhose préalable, mais cette situation est très rare. Dans ces cas, la seule issue est alors la transplantation hépatique. Le taux de charge virale, à savoir la quantité de virus dans le sang, ainsi que l'ancienneté de la contamination sont deux facteurs prédictifs de l'évolution vers une chronicité, et donc du développement d'une cirrhose ou d'un cancer.

Comme d'autres cancers, le CHC résulte d'un processus multifactoriel impliquant des facteurs à la fois de l'environnement et de l'hôte. Le virus de l'hépatite B n'étant à priori pas directement oncogène ; des éléments péjoratifs d'évolution ont été déterminés : âge, sexe, tabagisme, consommation d'alcool et certains facteurs hormonaux.

En Afrique, on est le plus souvent confronté soit à la découverte du portage du virus lors d'un bilan de routine ou le plus souvent au stade des complications de l'hépatite chronique B que sont la cirrhose et le cancer du foie (**Lunel-Fabiani F et coll., 2012**).

7. Diagnostic au laboratoire de l'infection par le VHB

Le diagnostic au laboratoire de l'infection par le virus VHB repose sur la détection de l'antigène de surface AgHBs du virus de l'hépatite B (**OMS., 2017**).

Les outils virologiques utiles pour le diagnostic, le suivi et la prise en charge thérapeutique des hépatites virales liées au virus de l'hépatite B (VHB) sont à la fois sérologiques et moléculaires. A côté des tests classiques de détection des antigènes viraux et des anticorps dirigés contre eux, de nouvelles techniques de biologie moléculaire permettent aujourd'hui une quantification plus sensible et plus précise de l'ADN viral. Les techniques utilisées permettent de distinguer les hépatites B aiguës des hépatites B chroniques, d'évaluer l'immunité vaccinale et de déterminer l'éligibilité du patient à la thérapie antirétrovirale.

7.1. Diagnostic biologique direct de l'infection par le VHB

Le diagnostic biologique direct ou diagnostic de certitude est par définition la mise en évidence du virus et/ou de ses constituants dans le foie ou le sérum.

7.1.1. La culture

La multiplication in vitro du VHB est possible mais reste réservée au domaine expérimental (**Roingard P., 1992**).

7.1.2. La microscopie électronique

Les particules de Dane ainsi que les sphères et les filaments produits en excès peuvent être mis en évidence assez facilement dans le sérum par microscopie électronique mais cette technique qui nécessite de fortes concentrations de particules virales n'est pas utilisée en routine.

7.1.3. La recherche des antigènes viraux

En pratique, les antigènes viraux sont mis en évidence dans le sang par des techniques immuno-enzymatiques de type ELISA (Enzyme Linked Immuno–Sorbent Assay) « sandwich » mais aussi par des techniques de dosage immunologique micro particulaire par chimiluminescence (CMIA).

L'élément essentiel du diagnostic d'une infection par le VHB en cours repose sur la mise en évidence, dans le sérum ou le plasma, de l'AgHBs. La recherche de l'AgHBs est la première étape de la stratégie diagnostique. L'antigène HBs est détecté dans le sérum de façon très précoce, environ 1 à 3 mois après la contamination et 2 à 4 semaines avant l'ictère (**Fafi-Kremer et coll., 2005**). Son élévation précède toujours l'apparition des manifestations cliniques et biologiques de l'hépatite B. Il persiste en moyenne 1 à 2 mois. La disparition de l'antigène HBs du sang d'un patient qui a fait une hépatite B traduit généralement sa guérison (**Carole E., 2007**). Le portage chronique du virus est défini par la présence de l'antigène HBs pendant plus de six (6) mois. Dans cette situation des explorations sont nécessaires afin de déterminer la phase de l'infection et la sévérité de la maladie du foie, afin de décider ou non d'un traitement et des modalités de la surveillance (**Parlier D., 2013**).

L'AgHBs peut également être quantifié dans le sérum ou le plasma humain. Au cours de l'évolution de l'hépatite B chronique le titre de l'AgHBs varie de façon important et semble être corrélé à l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc (**Jaroszewicz J., et coll. 2010**). Il reflète chez les malades antigènes HBe positifs, la quantité de cccDNA présent dans le noyau et chez ceux qui sont antigène HBe négatifs l'activité transcriptionnelle de ce cccDNA (**Chan HL. et coll., 2011**).

La détection de l'antigène HBe sérique demeure un marqueur de réplication du virus de l'hépatite B (**Trépo et coll., 1993 ; Zoulim et coll., 1992b**). L'AgHBe se comporte comme un marqueur d'infectiosité pour le sang et un marqueur de l'évolutivité de processus infectieux chez les malades sauf lors des mutations du gène préC/C pour lesquelles l'AgHBe est absent.

L'Ag HBc est intracellulaire, il n'est pas détecté dans le sérum. En revanche on le détecte sur une coupe de foie par immunofluorescence ou immuno-péroxydase, lorsqu'une biopsie hépatique est réalisée (**Krajden M., 2005 ; Mast E.E. et coll., 2005**).

7.1.4. Détection et quantification de l'ADN du VHB

La détection et la quantification du génome du VHB peuvent être réalisées dans le sérum, le tissu hépatique ou dans les cellules mononuclées sanguines. Elles reposent classiquement sur deux types de techniques (**Pawlotsky J.M., 2008**): les méthodes d'amplification de la cible de type Polymérase Chain Reaction (PCR) et les méthodes d'amplification de signal, comme la capture d'hybrides ou la technique des ADN branchés. Ces techniques sont progressivement remplacées dans les laboratoires de biologie moléculaire par les techniques de PCR dites «en temps réel». Ces dernières sont plus sensibles que les techniques classiques et bénéficient d'un intervalle de quantification linéaire plus étendu. Celui-ci permet une quantification précise des valeurs de charge virale observées sous traitement, faisant de ces techniques les instruments de choix du suivi de la réponse virologique à la thérapeutique. Enfin, les techniques de PCR en temps réel sont partiellement ou entièrement automatisées et entraînent un faible risque de faux positifs liés à des contaminations.

L'OMS a défini un standard international pour la quantification de l'ADN du VHB auquel il a été arbitrairement attribué une valeur de 1 000 000 UI/ml. (**J.Saldanha et coll., 2001**)

L'expression de la charge virale en UI/ml facilite ainsi la comparaison de différents tests. Des facteurs de conversion peuvent être utilisés pour établir la relation entre les UI/ml et les unités de quantification non standardisées.

Chez les sujets porteurs chroniques d'antigènes HBs, cette recherche sert à déterminer le degré d'infectiosité, l'intensité de la réplication et l'opportunité d'un traitement antiviral. En effet l'ADN viral est un meilleur marqueur de réplication virale que l'antigène HBe.

7.2. Diagnostic indirect de l'infection par le virus de l'hépatite B

C'est la recherche de la réaction immunologique de l'hôte. Le diagnostic sérologique permet la recherche et éventuellement la quantification des anticorps dirigés contre les différents antigènes viraux : anticorps anti-HBs, anticorps anti-HBc totaux et la fraction IgM et anticorps anti-HBe.

La présence des anti-HBc reflète un contact avec le virus : les IgM sont témoins d'une infection récente, alors que les IgG, anticorps non neutralisants, témoignent d'une infection chronique en cours ou d'une guérison.

Les anti-HBe sont utilisés pour le suivi du patient et la surveillance de la réponse au traitement. Leur apparition suggère une diminution de la réplication virale, une diminution de l'infectiosité et une rémission de la maladie.

Les anti-HBs sont des anticorps neutralisants ; leur présence signifie soit une guérison, soit une immunisation (naturelle ou vaccinale). Une concentration d'anticorps supérieure à 10 mUI/ml signifie que le sujet est immunisé (Jack, A. D. et coll., 1999 ;Krajden M. et coll., 2005;Mast E.E. et coll., 2005).

Tableau II: Diagnostic d'une hépatite B (Lunel-Fabiani F. et coll., 2012)

	AgHBs	Ac anti-HBs	AgHBe	Ac anti-HBe	Ac anti-HBc	ADN-VHB	ALAT
Hépatite aiguë	+	-	+	-	+ (IgM)	+	+++
Hépatite aiguë guérie	-	+	-	+	+ (IgG)	-	N
Hépatite chronique (sauvage)	+	-	+	-	+	> 10 ⁵ copies/ml	+
Hépatite chronique (mutant)	+	-	-	+	+	>10 ⁴ copies/ml	+
Porteur chronique inactif de l'AgHBs	+	-	-	+	+	< 10 ⁴ copies/ml	N

7.3. Cinétique des marqueurs

7.3.1. Au cours d'hépatites aiguës d'évolution favorable

L'Ag HBs est le premier marqueur d'identification de l'infection aiguë (Figure 6). Après un délai moyen de 4 à 12 semaines après le contage, l'AgHBs devient détectable dans le sérum. Cette présence peut précéder les signes biologiques (augmentation des transaminases) et l'ictère de 2 à 4 semaines. Il persiste de 4 à 8 semaines disparaissant plusieurs semaines après normalisation des transaminases.

Les anticorps anti-HBc sont décelables 6 semaines après l'infection. Ils persistent à un titre élevé durant toute la phase aiguë ; ils sont un marqueur très fiable de l'infection à VHB. Initialement, ces anti-HBc sont constitués à la fois d'anticorps de type IgM et IgG. Puis, les anti-HBc (IgM) diminuent progressivement dès le 4^e mois suivant l'infection, alors que les IgG persistent à long terme.

La présence d'AgHBe signe la réplication virale, il est détecté dans le sérum à partir de la cinquième semaine et va persister dans le sérum avant de disparaître au sixième mois. La

séroconversion de l'AgHBe en Ac antiHBe survient vers la vingtième semaine. Elle représente un moment important de l'évolution de la maladie aiguë car elle traduit l'arrêt de la réplication virale.

Les Ac antiHBs apparaissent plus ou moins rapidement plusieurs mois après la disparition de l'AgHBs et environ six mois après le contage par le VHB.

Une évolution favorable est caractérisée par la normalisation des transaminases, la disparition de l'AgHBs et l'apparition des Ac anti-HBe et Ac anti- HBs. L'ADN détecté dans le sérum à la troisième semaine, témoigne de la réplication virale (**Lunel-Fabiani F. et coll., 2012**).

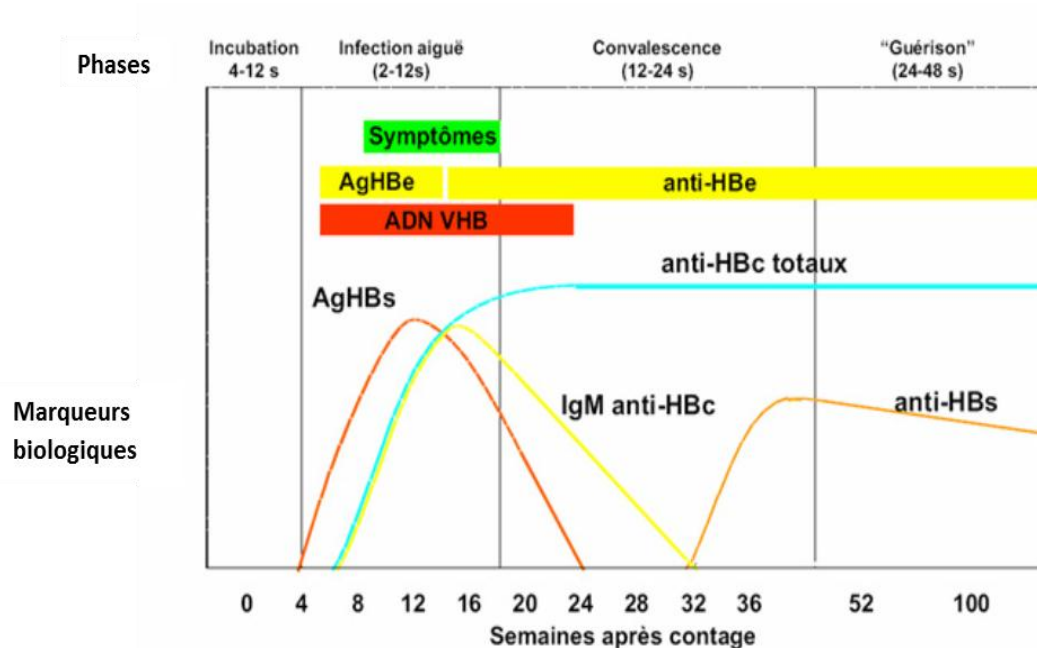


Figure 6: Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite B aiguë d'évolution favorable.

Les barres horizontales vertes, jaunes et rouges représentent respectivement la période symptomatique, l'apparition de l'Ag HBe suivie des anticorps anti-HBe, l'ADN viral. La cinétique de l'Ag HBs (courbe rouge), des IgM anti-HBc (courbe jaune), des anticorps anti-HBc (courbe bleue) et des anticorps anti-HBs (courbe orange) est également représentée (Bekondi C., 2008).

7.3.2. Au cours d'hépatites fulminantes

La survenue d'une hépatite fulminante au cours d'une hépatite B aiguë est marquée par la présence d'IgM anti-HBc. Les autres marqueurs (AgHBs, AgHBe, Ac anti HBs et ADN du

VHB) sont inconstamment retrouvés dans le sérum (**Nagalo B.M., 2012**). En revanche, lors des hépatites fulminantes survenant chez des porteurs chroniques (dues à des réactivations spontanées ou chimio-induites, ou à une surinfection par le virus de l'hépatite delta) la détection des IgM anti-HBc est rare (**Denis F. et coll., 2001**).

7.3.3. Au cours d'hépatites chroniques

Les profils sérologiques de l'hépatite chronique sont caractérisés par la persistance de l'AgHBs au-delà de 6 mois, de l'AgHBe et des Ac anti-HBc (figure 7). Les deux antigènes peuvent rester détectables durant plusieurs années, voire la vie entière. Les Ac antiHBc apparaissent vers la sixième semaine et persistent dans le sérum à des taux importants pendant toute la durée de l'infection mais les IgM antiHBc diminuent progressivement et finissent par s'annuler après le sixième mois. Parallèlement, les transaminases demeurent anormalement élevées. Le portage inactif est caractérisé par le portage chronique de l'AgHBs avec des transaminases normales, une histologie hépatique normale, la présence d'Ac anti-HBe et une charge virale non détectable. Des réactivations virales sont cependant possibles. La durée de la positivité de l'Ag HBe est variable ; en effet la séroconversion «e» (négativation de l'AgHBe, apparition des Ac anti-HBe) peut survenir mais elle n'est pas toujours associée à une négativation de l'ADN viral sérique. Il arrive qu'à long terme l'AgHBs disparaisse à son tour et que, parfois, des Ac anti-HBs émergent à des taux très faibles : cette séroconversion HBs ne survient que chez 5 à 10 % des patients. Dans ce cas, seuls les Ac anti-HBc restent détectables, quasi indéfiniment. Au cours des hépatites chroniques, la charge virale varie selon les phases de l'infection : elle est relativement élevée pendant la phase d'immunotolérance, puis chute lors de la phase d'équilibre jusqu'à devenir parfois indétectable (**Mazet A.A., 2006**).

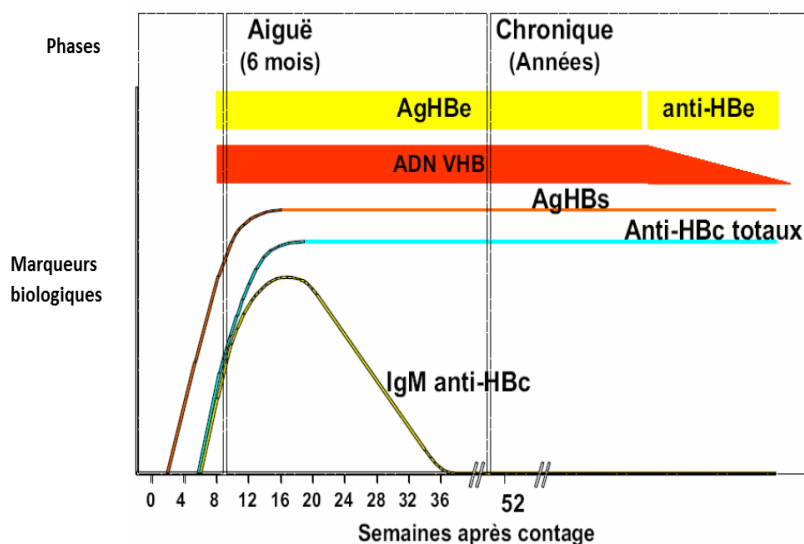


Figure 7 : Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite chronique.

Les barres horizontales jaunes et rouges représentent respectivement les périodes d'apparition de l'Ag HBe et des anticorps anti-HBe, ainsi que l'ADN viral. La cinétique de l'Ag HBs (courbe orange), des IgM anti-HBc (courbe verte) et des anticorps anti-HBc totaux (courbe bleue) est également représentée (Bekondi C., 2008)

7.4. Apport de la charge virale dans le suivi de l'évolution de l'hépatite B chronique

La charge virale correspond à la quantité de génome viral circulant dans l'organisme ; elle est un élément essentiel pour le suivi de l'hépatite B chronique afin de prévenir les éventuelles complications de l'infection que sont la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Donc la détection et la mesure de l'ADN du VHB constituent des éléments clés de la prise en charge de l'hépatite chronique B (Castera L., 2004). La quantification de l'ADN du VHB est un élément déterminant pour apprécier la réplication virale (multiplication du VHB). Il a été démontré que la charge virale permettait d'évaluer le risque d'évolution vers un cancer du foie : un niveau élevé de charge virale, supérieur à 10 000 copies/ml est un important prédicteur de risque d'évolution vers un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Chen C. J. et coll., 2006). Une corrélation a également été établie entre la variation de la charge virale et la séroconversion HBe. En effet, des études trouvèrent qu'une diminution significative (spontanée ou à la suite d'un traitement) de la charge virale, était un facteur prédicteur de la séroconversion HBe (Liu C.J. et coll., 2006 ; Yamaura T. et coll., 2003).

La détection de l'ADN viral est également importante pour diagnostiquer des hépatites occultes, définies par une sérologie négative pour l'Ag HBs avec un niveau bas de charge virale. Dans ces cas, les taux sériques d'ADN du VHB sont inférieurs à 10^3 copies/ml et les taux d'ADN viral retrouvés dans le tissu hépatique sont également bas chez les patients AgHBs négatifs présentant une hépatite chronique avec cirrhose. Cette situation particulière montre l'importance de la mise en place de techniques sensibles pour la quantification des charges virales faibles (**Brechot C. et coll., 2001**).

8. Traitement de l'infection par le virus de l'hépatite B

Le but du traitement est d'améliorer la qualité de vie, d'empêcher la progression de la maladie vers la cirrhose, la décompensation hépatique, l'hépatocarcinome et le décès (**EASL 2012**). La suppression permanente de la réplication virale à des niveaux indétectables de la charge virale est l'objectif majeur du traitement (**EASL 2012**). Elle peut rendre réversible la fibrose hépatique voire la cirrhose chez de nombreux patients (**Marcellin P. et coll. 2011**). La séroconversion AgHBe est un autre objectif si la réplication virale est durablement maintenue à de faibles niveaux (**van Bömmel F. et coll., 2013**). La séroconversion AgHBs, ultime objectif du traitement, reste difficile à atteindre. Les taux sériques d'AgHBs avant et durant le traitement par l'IFN sont devenus un marqueur de la réponse au traitement et du risque de développement d'un CHC chez les patients ayant de faibles taux sériques d'ADN-VHB (**van Bömmel F. et coll., 2013**).

La guérison est exceptionnelle avec le VHB, en raison notamment de la très longue persistance de l'ADNccc intra-hépatique et des formes intégrées d'ADN viral dans l'ADN chromosomique de l'hôte (**Pol S., 2006**).

Le traitement antiviral est indiqué chez les patients atteints d'hépatite chronique B en phase immuno-active quel que soit le statut de l'antigène HBe. Selon les lignes directrices de l'EASL, le traitement est indiqué chez les patients ayant un taux d'ADN du VHB > 2000 UI/mL, et/ou un taux d'ALAT supérieur à la normale et au moins une fibrose ou une nécro-inflammation du foie modérée (**EASL 2012**).

Actuellement, il existe 2 différentes stratégies thérapeutiques : un traitement immunomodulateur à durée limitée avec l'interféron (IFN) ou l'IFN-pégylé (PEG-IFN) et un traitement à long terme par des antiviraux, les analogues nucléos(t)idiques. Ces agents antiviraux induisent une viro-suppression efficace qui s'accompagne d'une normalisation des transaminases et de l'histologie hépatique (**Zoulim F., 2008**).

L'évaluation de l'efficacité du traitement antiviral est fondée sur des mesures répétées de la charge virale et de l'activité sérique des ALAT, en principe tous les 3 à 6 mois (**Lok A.S. et coll., 2007**). Les critères de réponse au traitement sont :

- une séroconversion HBe, une réduction de la charge virale au-dessous de 2.10^4 UI/mL et une normalisation de l'activité sérique des ALAT chez les patients AgHBe positif ; chez ces patients un taux de séroconversion HBe d'environ 30 % est observé six mois après l'arrêt du traitement par l'interféron et reste faible, à environ 20 % après un an de traitement avec les analogues nucléosidiques (**Lau G.K. et coll., 2005 ; Janssen H.L et coll., 2005**)
- une charge virale indétectable par une méthode sensible et une normalisation de l'activité sérique des ALAT chez les patients infectés à la naissance ou au cours de la petite enfance (**Lai C.L. et coll., 2007**) ;

Chez les patients ayant un AgHBe(-) ou chez les patients AgHBe(+) n'ayant pas obtenu de séroconversion après un traitement à court terme qui reçoivent des analogues nucléos(t)idiques, l'objectif du traitement est que l'ADN VHB soit indétectable par les méthodes de PCR en temps réel. Lorsqu'une réponse virologique au traitement a été observée (réduction significative de la charge virale) et qu'elle est suivie d'une rechute caractérisée par une augmentation de la charge virale d'au moins 1 Log_{10} UI/mL par rapport au nadir, une résistance virale au traitement doit être suspectée, après vérification de l'observance thérapeutique (**Pawlotsky JM., 2008**).

9. Prévention de l'infection par le VHB

Elle repose sur des mesures d'hygiène, sur l'immunoprophylaxie passive et sur la vaccination.

Entre autres mesures d'hygiène on peut citer :

- L'amélioration de la qualité des produits sanguins transfusés par le dépistage systématique,
- La prévention des comportements à risque en ayant par exemple des rapports sexuels protégés ou bien
- Eviter le partage de matériel chez les toxicomanes.

L'immunoprophylaxie passive consiste en la perfusion d'immunoglobulines et est proposée dans 3 situations cliniques : les nouveaux nés dont la mère est porteuse du VHB (et ce, en association avec une vaccination) ; les porteurs chroniques du VHB ayant subi une transplantation hépatique et les personnes non vaccinées ayant été en contact avec le virus.

Pour la vaccination, dans les pays d'endémicité faible à moyenne, il convient de vacciner tous les enfants et les adolescents de moins de 18 ans qui ne l'ont pas encore été. Dans ces pays, on vaccinera également les personnes appartenant à des groupes à haut risque, et notamment:

- les personnes qui ont besoin fréquemment de sang ou de ses dérivés, les patients dialysés et les receveurs de transplantations d'organes,
- les détenus,
- les consommateurs de drogues injectables,
- les partenaires sexuels des sujets porteurs du virus de l'hépatite B et les personnes partageant le foyer de personnes infectées de façon chronique par le virus de l'hépatite B,
- les personnes ayant de multiples partenaires sexuels, ainsi que les personnels de santé exposés à du sang et à des produits sanguins de par leur travail,
- et les voyageurs qui n'ont pas été complètement vaccinés devraient se voir proposer le vaccin avant de se rendre dans une zone d'endémie **(OMS., 2017)**.

Le schéma standard consiste en trois injections intramusculaires dans le deltoïde (adultes) ou dans la face antérolatérale de la cuisse (enfants) à la naissance, à un et six mois. En zone de forte endémicité, comme en Afrique certains pays appliquent un calendrier plus rapproché à 0, 1 et 2 mois avec des vaccins monovalents ou à 6, 10,14 semaines avec des vaccins combinés **(PNLH, 2013)**.

En réponse aux recommandations de l'OMS, le Sénégal a intégré la vaccination pédiatrique systématique contre le VHB dans le Programme élargi de vaccination (PEV) en 2005 et les trois doses du vaccin pentavalent sont administrées à l'âge de 6, 10 et 14 **(OMS., 2017)**. Cependant cette vaccination pédiatrique systématique ne permet pas de contrôler l'endémie. C'est ainsi qu'en février 2016, le Sénégal a pris l'option de vacciner les nouveaux nés dans les premières 24 heures suivant leur naissance. Pour ce qui est des adultes non contaminés par le VHB leur vaccination passe par des campagnes de sensibilisation et de dépistage pré vaccinal destinées ainsi à limiter la population à vacciner, en éliminant du programme de vaccination les sujets déjà porteurs de marqueurs sérologiques d'infection par le VHB.

Deuxième partie : travail expérimental

Chapitre I: Justificatif, cadre, type et période de l'étude et échantillonnage

1. Justificatif de l'étude

Le Sénégal constitue une zone de forte endémicité avec 85 % de la population générale présentant au moins un marqueur viral pour l'hépatite B et une prévalence de porteurs chroniques du virus comprise entre 12 et 17% et (PNLH., 2014). La gravité de la maladie repose sur les complications qu'elle entraîne à savoir la fibrose, la cirrhose, le CHC et éventuellement le décès. Afin de prévenir ces complications, un outil de suivi pour l'hépatite B chronique s'impose : il s'agit de la détection de l'ADN viral par PCR qui permettra une mesure plus directe et fiable de la répllication virale, la prise de décision de la mise sous du traitement antiviral et le suivi de la réponse virologique à la thérapeutique. Les techniques offrant le dosage de l'ADN du VHB nécessitent des structures de biologie moléculaire avec du personnel qualifié. Cependant une rareté de ces structures et un coût élevé des tests sont notés dans les pays à ressources limités. De même, il leur faut un certain nombre d'échantillons pour la réalisation des tests ce qui peut amener à un très long délai d'attente du résultat. Tout cela constitue ainsi des facteurs limitants dans le suivi de l'hépatite B chronique. Au Sénégal, les techniques commerciales de PCR en temps réel utilisées pour la quantification de l'ADN viral du VHB étaient représentées par les systèmes *COBAS AmpliPreP/COBAS Taqman®* (Roche Molecular Diagnostics, Bâle Suisse) et *m2000®* (Abbott molecular diagnostics, Wiesbaden, Allemagne). De nouvelles plateformes de PCR en temps réel permettant la réalisation des tests avec le moins d'échantillons et un moindre coût, ont été développées parmi lesquelles *AMPLIX® HBV* (Biosynex, France). L'utilisation de cette technique dans la prise en charge des hépatites virales passe nécessairement par son évaluation sur site. C'est dans ce contexte que ce travail a été entrepris et avait pour objectif général à partir de plasmas congelés à -20°C

- De vérifier les performances sur site de la technique de PCR en temps réel *AmpliX® (HBV)* en comparaison avec la technique *Cobas AmpliPrep™/Cobas TaqMan™ HBV*

Pour atteindre cet objectif général le travail avait pour objectifs spécifiques

- De procéder à la validation technique de la plateforme de PCR en temps réel *AMPLIX® pour la quantification de l'ADN du VHB*
- De comparer les résultats de charges virales obtenus par *AmpliX® (HBV)* avec ceux obtenus avec *Cobas AmpliPrep™/Cobas TaqMan™ HBV*
- De faire une comparaison opérationnelle des 2 techniques.

2. Cadre, type et période de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale qui s'est déroulée entre Février et Juin 2016. Elle a eu pour cadre le laboratoire du Centre Médical Inter Armées (CMIA) et l'unité de biologie moléculaire du Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Aristide Le Dantec. Le laboratoire du CMIA est un laboratoire d'analyses biomédicales tandis que le laboratoire de Bactériologie-Virologie est hospitalo-universitaire et a pour vocation le diagnostic biologique des infections bactériennes et virales, la recherche et la formation dans les domaines de la bactériologie, de la biologie moléculaire, de l'immunologie et de la virologie.

3. Echantillonnage

L'étude a été réalisée sur 42 échantillons de plasma congelés à -20°C et choisis dans la gamme de linéarité des techniques. Ces échantillons ont été obtenus de sujets porteurs chroniques du VHB, de sexe et d'âge différents, venus faire leur charge virale de contrôle au niveau du Laboratoire du Centre Médical Inter Armées.

Chapitre II : Méthodologie

1. Matériel et réactifs (voir annexes)

2. Méthode

L'étude a porté sur la quantification de l'ADN viral du VHB. Des échantillons de plasma obtenus après centrifugation des prélèvements de sang veineux sur tube EDTA ont été utilisés pour faire cette quantification. Après une évaluation des critères de performances de la technique de PCR en temps réel *AMPLIX®*, la charge virale a été réalisée et par la suite les échantillons ont été retestés avec la technique *Cobas AmpliPrep™/Cobas Taqman™ HBV*. Ainsi les résultats de charge virale obtenus à partir des 2 méthodes ont été comparés.

3. Evaluation des critères de performance de la technique de PCR en temps réel

AMPLIX® HBV

Les performances de la technique de PCR en temps réel *AMPLIX® HBV*, ont été évaluées selon les recommandations du Comité Français d'accréditation (COFRAC) pour la validation des méthodes d'analyse quantitatives (portée flexible de type B). Les paramètres suivants ont été déterminés : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (reproductibilité), la justesse, l'incertitude et la contamination inter-échantillons. Les résultats obtenus ont ensuite été comparés avec ceux d'une méthode de référence (*CobasTaqman™*).

3.1. Répétabilité

L'évaluation de la répétabilité consiste à analyser un même échantillon par un même opérateur, utilisant le même équipement (même lot de réactif, même instrument, même étalonnage) et pendant un court intervalle de temps. Au cours de cette étude, nous avons testé 2 niveaux de concentration: 4 et 7 log₁₀ UI/ml correspondant respectivement aux contrôles faible et fort du kit *Hepatitis B virus (HBV) PCR (GeneProof)*. Chacun de ces niveaux de concentration a été testé 15 fois, au cours d'un seul et même essai réalisé par le même opérateur, utilisant le même lot de réactifs, les mêmes instruments. L'exploitation des résultats a consisté à calculer la moyenne (m), l'écart-type (SD) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série. Les valeurs de CV ont été validées par rapport au seuil d'acceptabilité (<15%) recommandé pour la validation des technologies basées sur la détection des acides nucléiques.

3.2. Reproductibilité ou fidélité intermédiaire

Elle consiste à analyser un même échantillon de Contrôle Interne de Qualité (CIQ) au quotidien dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages... Pour cette étude, nous avons testé les 2 niveaux de contrôle 7 log UI/ml (contrôle fort) et 4 log UI/ml (contrôle faible) provenant du même lot du kit *Hepatitis B virus (HBV) PCR (GeneProof)* dans 15 séries différentes. L'exploitation des résultats et l'appréciation des CV sont identiques à celles de la répétabilité.

Les résultats de la fidélité intermédiaire sont confirmés en traçant le diagramme de suivi des contrôles utilisés, le Levey-Jennings. Ce diagramme permet de représenter les différents points des 2 niveaux de concentrations en fonction de leur dispersion autour de la moyenne, en fonction du temps.

La valeur des contrôles doit être la plus proche possible de la moyenne. Trois cas majeurs d'erreurs peuvent entraîner une invalidation de la série :

- Un contrôle situé au-delà des limites de $M \pm 3ET$
- Si deux contrôles se suivent dans la zone comprise entre $M \pm 2ET$ et $M \pm 3ET$, la deuxième série incluant ce contrôle est invalidée.
- Si 10 contrôles se suivent du même côté par rapport à la moyenne, alors les séries sont invalides. Ce cas témoigne de la présence d'une erreur systématique.

3.3. Justesse et Incertitude

La justesse, quantifiée par le biais, est estimée en comparant la moyenne (**m**) obtenue lors de l'étude de fidélité intermédiaire (établie sur les 2 niveaux de contrôle 7 et 4 log UI/ml) à la valeur "vraie" (**v**), connue, de l'échantillon testé. Elle est exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

$$\text{Justesse} = \text{Biais en \%} = (m - v) \times 100 / v$$

L'EMA (European Medicine Agency 2011) a établi un seuil d'acceptabilité à 15%.

L'incertitude a été calculée à partir des données de la justesse et de la reproductibilité intra-laboratoire.

Soit **U₁** l'écart type de la composante d'incertitude due à la reproductibilité intra-laboratoire et **U₂** la composante d'incertitude due à l'erreur de justesse (E justesse).

U₁ = écart type de la reproductibilité

$$U_2 = (E \text{ justesse}) / \sqrt{3} \quad \text{avec } E \text{ justesse} = (m - v)$$

m = moyenne et v = valeur **vraie**

$$\text{L'incertitude combinée } (U_c) = U_c = \sqrt{U_1^2 + U_2^2}$$

L'incertitude élargie U est alors calculée en utilisant la formule suivante

$$U = 2U_c$$

Ceci permet d'indiquer que l'intervalle compris entre la valeur mesurée +/- U contiendra conventionnellement la valeur "**vraie**" à **95 %** dans le cas d'une distribution gaussienne.

Le résultat de la mesure analytique R s'exprimera alors comme suit :

$$\mathbf{R = \text{valeur mesurée} \pm U \quad (\text{unité})}$$

3.4. Contamination entre les échantillons

Pour la contamination, l'échantillon de 7 log₁₀ IU/ml a été analysé trois fois consécutivement (H1, H2, H3 avec mH de moyenne) suivi de l'échantillon de 4 log₁₀ UI / ml analysé également trois fois de suite (B1, B2, B3). La séquence H1, H2, H3 et B1, B2, B3 a été répétée 5 fois pour déterminer les moyennes B1 (mB1) et B3 (mB3). Une différence statistique significative entre les deux moyennes a été établie avec le test Student avant de calculer le pourcentage de contamination selon la formule suivante :

$$\mathbf{\text{Contamination en \%} = (mB1 - mB3) \times 100 / (mH - mB3)}$$

3.5. Comparaison de la technique **AMPLIX® HBV** avec une technique de référence (*Cobas Taqman*)

Après vérification des performances du test **AMPLIX® HBV** nous avons effectué la comparaison avec la technique de référence **Cobas Taqman™** en testant en parallèle avec les 2 techniques 42 échantillons. La comparaison des 2 techniques a consisté à évaluer la corrélation et la concordance entre les 2 méthodes.

La corrélation ou la régression linéaire consiste à tester l'hypothèse de l'existence d'une relation de proportionnalité entre deux variables quantitatives. Divers types de renseignements sont fournis par la régression linéaire. En premier lieu, le coefficient r de Pearson évalue le degré de linéarité de la relation testée, son carré (r²) représentant le pourcentage de variabilité expliquée par le modèle linéaire, plus la valeur du r est proche de 1 plus les 2 techniques sont corrélées. La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite sont

fournies par le calcul de la meilleure droite possible (selon la méthode des moindres carrés), passant au sein du nuage de points. Ces caractéristiques de la droite sont très utiles pour prédire, si la technique à tester s'avère valable (**Grenier B. et coll., 2000**).

La concordance de Bland et Altman consiste à apprécier l'écart observé (biais) entre les valeurs obtenues par une technique de référence par rapport à une technique à tester et les limites de concordance qui représentent les écarts des valeurs d'une technique par rapport à l'autre. La concordance permet d'apprécier l'écart observé entre les 2 valeurs obtenues pour la mesure et d'en déduire, sur l'ensemble de la population observée, le biais, la précision, et les limites de l'intervalle de confiance à 95% afin de statuer sur la concordance des 2 séries de valeurs. Les limites de concordance correspondent à un biais +/- 2 Ecart-Type (ou déviation). Il représente la moyenne de l'écart systématique d'une série de valeurs par rapport à l'autre et entre lesquelles se trouvent 95% des valeurs de différences.

Le principe de la méthode de Bland et Altman consiste à réaliser un graphe étudiant en ordonnée la différence entre les valeurs obtenues par les deux techniques A et B (soit $A - B$) et en abscisse la moyenne des valeurs obtenues par ces deux techniques, soit $(A + B)/2$. Plus la valeur du biais tend vers zéro, plus la concordance est meilleure (**Grenier B. et coll., 2000**).

4. Dosage de l'ADN du VHB par la technique *Cobas AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ HBV (CAP/CTM HBV)*

La technique *COBAS Taqman™* est un test de PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN du VHB dans le plasma d'individus infectés par ce virus. Cette technique repose sur l'extraction automatisée de l'ADN du VHB par l'appareil *COBAS AmpliPrep™*, couplée à l'amplification et la détection simultanée de l'ADN cible par l'analyseur *COBAS Taqman 48*. (**Alice T. et coll., 2007; Hochberger S. et coll., 2006**)

4.1. Principes de quantification

4.1.1. Extraction

L'extraction est entièrement automatisée et repose sur la capture de l'ADN viral par des billes de silice. La procédure utilise 650ul de plasma-EDTA. Les particules virales sont lysées par incubation à température élevée en présence d'un tampon chaotropique et d'une protéase. Durant le processus d'extraction, un standard interne de quantification (QS) est introduit dans chaque échantillon. L'ADN viral et l'ADN du QS se fixent alors à la surface de particules de verre magnétiques. Les substances telles que les sels, les protéines et d'autres impuretés qui

n'auront pas été fixées seront éliminées après lavage des particules magnétiques. L'élution est réalisée à haute température (80°C) avec une solution aqueuse.

4.1.2. Addition du master mix

Les extraits purs d'ADN viral (ainsi que l'ADN du QS) sont ensuite ajoutés dans des microtubes contenant le mélange réactionnel (Master Mix) de la réaction de PCR. Ce dernier contient un tampon (tricine buffer), de l'acétate de potassium, de l'hydroxyde de potassium, du glycérol, des dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), de l'azide de sodium, l'ampérase uracile N-glycosylase, de courtes séquences d'oligonucléotides (oligonucléotide aptamer), de l'acétate de manganèse, les amorces sens et anti-sens qui ciblent la région **pré-core/core du VHB**, des sondes oligonucléotidiques spécifiques pour le VHB et le QS et la ZO5 polymérase. Le Master Mix a été développé de manière à assurer une quantification des génotypes A à G du VHB.

Le mélange extrait d'ADN-Master Mix est alors transféré dans l'analyseur *COBAS TaqMan™ 48*.

4.1.3. Amplification Détection

Deux cibles sont amplifiées au cours de la réaction : l'ADN viral et le QS. Ce dernier est une construction d'ADN non infectieux contenant des fragments de séquence d'ADN du VHB avec des régions de liaison d'amorces identiques à celles du VHB, mais des sites de liaison de sondes différents de ceux du VHB. Les sondes Taqman sont des sondes hydrolysables avec un reporter à l'extrémité 5' et un quencher en 3'. Les sondes du VHB et du QS présentent le même groupement quencher mais leurs reporters sont différents pour permettre une identification indépendante des amplicons VHB et QS. Lorsque les sondes sont libres, la fluorescence émise par le reporter est absorbée par le quencher, du fait de la proximité des deux groupements fluorophores. Lorsque la sonde se fixe à sa séquence cible au cours de l'étape d'élongation, l'activité 5'-3' exonucléasique de l'ADN polymérase permet l'hydrolyse de la sonde hybridée. Le clivage de la sonde a pour conséquences la séparation des 2 fluorophores et l'émission de fluorescence du reporter. Cette émission augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde. L'intensité de fluorescence émise par le reporter est alors mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification. Le cycle seuil est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN cible dans le plasma ou le sérum.

L'analyseur *COBAS TaqMan™* fournit une quantification absolue de l'ADN viral en utilisant le QS. Ce dernier sert de standard interne de quantification et l'analyseur calcule la

concentration plasmatique de l'ADN-VHB en comparant le signal obtenu pour le VHB avec celui obtenu pour le QS. La prévention de contaminations croisées est assurée par l'incorporation de l'Uracile-N-glycosylase et de deoxyuridine triphosphate (dUTP) (**Alice T. et coll., 2007;Hochberger S. et coll., 2006**). Selon le fournisseur, la sensibilité de la technique est de 12 UI/ml (70 copies/ml), avec un intervalle de quantification compris entre 54 à $1,1.10^8$ UI/ml (1.7 à 8 \log_{10} UI/ml) (**Alice T. et coll., 2007;Hochberger S. et coll., 2006**).

5. Mesure de la charge virale du VHB par la technique de PCR en temps réel

AMPLIX® HBV

La technique AMPLIX®HBV est un test de PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN du VHB dans le plasma d'individus infectés par ce virus. Cette technique repose sur l'extraction automatisée de l'ADN du VHB par l'appareil *Amplix® NG 16*, couplée à l'amplification et la détection simultanée de l'ADN cible par l'analyseur *Amplix® NG 48*.

5.1. Principes de quantification

5.1.1. Extraction

L'ADN viral est extrait partir de 200ul d'échantillons cliniques en utilisant un tampon de lyse (Buffer Cartridge^②) pour déstructurer la membrane virale. Le tampon de lyse contient du thiocyanate de guanidine, qui agit comme un agent chaotropique. Le tampon de lyse dissocie les molécules d'eau des acides nucléiques et des billes magnétiques de silice. Ceci induit une charge négative à l'acide nucléique et une charge positive aux billes magnétiques de silice. Ainsi une liaison de l'ADN à la surface des billes est notée. Le tampon de lavage (Buffer Cartridge^①) rince toutes les impuretés qui peuvent exister. A la dernière étape l'ADN pur est dissocié des billes magnétiques grâce au tampon d'élution.

5.1.2. Amplification Détection

La détection du VHB est basée sur l'amplification d'une séquence d'ADN conservatrice spécifique du cadre de lecture ouvert X (ORF_x) et sur la mesure de la concentration du produit d'amplification en utilisant un processus de PCR et des sondes marquées à un fluorophore spécifique. La présence du VHB est indiquée par la croissance de la fluorescence du fluorophore FAM. Un standard interne de quantification (CI) est inclus dans le kit de PCR, contrôlant l'inhibition possible de la PCR et la qualité du processus d'extraction de l'ADN. Une amplification positive du CI est détectée dans le canal de fluorescence du fluorophore

HEX. Le kit de détection utilise la technologie «hot start», minimisant les réactions non spécifiques et assurant une sensibilité maximale. Prêt à l'emploi, le Master Mix contient de l'Uracil-ADN-Glycosylase (UDG), éliminant la contamination possible de la réaction de PCR par des produits d'amplification.

La sensibilité de la technique est de 26 UI/ml avec un intervalle de quantification compris entre 26,0 à $1,3 \cdot 10^8$ UI/ml ($1.41 - 8.74 \log_{10} \text{IU/mL}$).

6. Analyse statistique des données

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels Excel, Epi info 7 et Method Validator.

Le logiciel Microsoft Office Excel 2007 a permis la saisie des données, la conversion des résultats de charge virale en valeur logarithmique, le calcul des différences de log et le calcul de certaines valeurs statistiques (moyenne, écart-type...).

L'analyse statistique a porté sur la détermination de la corrélation et la concordance grâce au logiciel MethVal® en considérant le Cobas Taqman™ comme méthode de référence.

Chapitre III : Résultats

1. Etude des critères de performance de la technique de PCR en temps réel *AMPLIX® HBV*

1.1. Répétabilité

La répétabilité de la technique a été évaluée en testant 2 niveaux de concentrations (4 log UI/ml et 7 log UI/ml) correspondant respectivement aux contrôles faible et fort du kit *Hepatitis B virus (HBV) PCR (GeneProof)*. Ces deux concentrations ont été testées 15 fois chacune dans une même série. Les coefficients de variation (CV) obtenus étaient respectivement de 2,12% et de 1,60% pour 4 log IU/ml et 7 log IU/ml. (Tableau III)

Tableau III: Résultats de la répétabilité de la technique Amplix

	Répétabilité 4 log	Répétabilité 7 log
Valeurs	4,52	7,49
	4,41	7,63
	4,54	7,64
	4,42	7,66
	4,53	7,91
	4,51	7,69
	4,491	7,77
	4,59	7,82
	4,20	7,72
	4,47	7,83
	4,42	8
	4,51	7,86
	4,51	7,76
	4,63	7,79
	4,49	7,86
Moyenne (M)	4.86	7.76
Ecart type (ET)	0.09	0.12
Coefficient de variation (%)	2.12	1.60

1.2. Reproductibilité

La reproductibilité intra-laboratoire de la technique a été évaluée en testant les 2 niveaux de concentration de 4 logUI/ml et 7 log UI/ml des contrôles positifs du kit *Hepatitis B virus (HBV) PCR (GeneProof)* sur 15 séries. Les CV obtenus étaient respectivement de 6,65% et 3,15% pour les deux concentrations 4 logUI/ml et 7 log UI/ml.

Tableau IV: Résultats de l'analyse de reproductibilité intra-laboratoire de la technique Amplix

	Reproductibilité 4 log	Reproductibilité 7 log
15/06/2017	4,11	7,14
16/05/2017 -(8h)	4,19	7,46
16/06/2017-(14h)	3,51	7,07
18/06/2017-(21h)	3,60	7,17
19/06/2017-(8h)	4,10	7
19/06/2017-(21h)	3,64	7,17
Dates 20/06/2017-(10h)	3,65	6,99
20/06/2017-(20h)	3,98	7,17
21/06/2017-(8h)	4,06	7,41
21/06/2017-(21h)	4,04	7,23
22/06/2017-(8h)	3,89	7,17
22/06/2017-(20h)	4,09	7,36
23/06/2017-(8h)	3,50	7,54
23/06/2017-(8h)	4,38	6,77
27/06/2017-(10h)	3,91	7,64
Moyenne (M)	3.91	7.22
Ecart type (ET)	0.26	0.23
Coefficient de variation(%)	6.65	3.15

Les coefficients de variation obtenus pour les 2 niveaux de concentration sont inférieurs à 15% comme recommandé pour la validation des technologies basées sur la détection des acides nucléiques. Ainsi la dispersion des valeurs autour de la moyenne est faible. Pour confirmer les résultats de la fidélité intermédiaire, nous avons tracé le diagramme de suivi des contrôles utilisés, le Levey-Jennings (Figures 8 et 9).

La figure 8 montre que la moyenne du niveau de concentration (4 log UI / ml) est comprise entre $M \pm ET$ pour 60%. Les 30% restants ne dépassent pas $M \pm 2$.

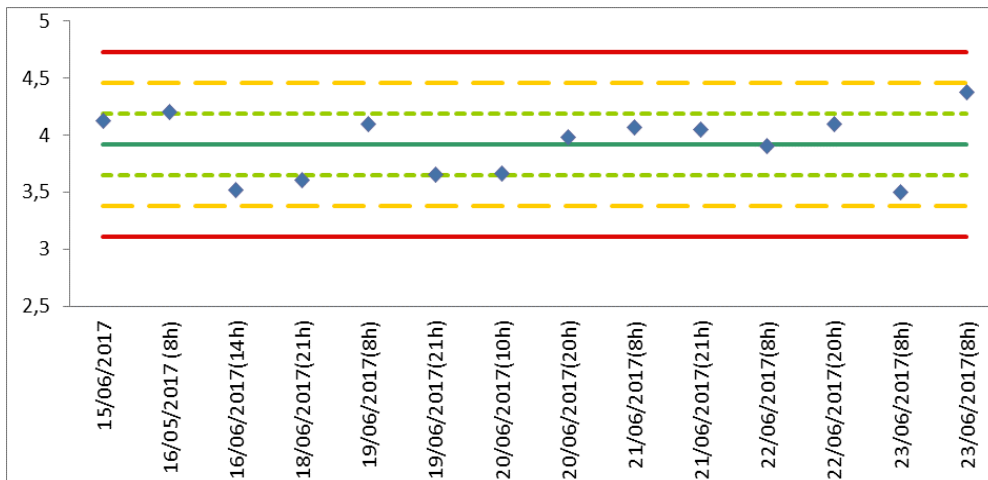


Figure 8: Diagramme de levey-jennings du niveau de concentration 4 log₁₀ UI/ml

Sur la figure 9, on observe que 80% des valeurs du niveau de concentration égal à 7 log UI / ml ne dépassent pas $M \pm 1ET$, 20% des valeurs sont supérieures à $M \pm 1ET$ sans dépasser $M \pm 2ET$

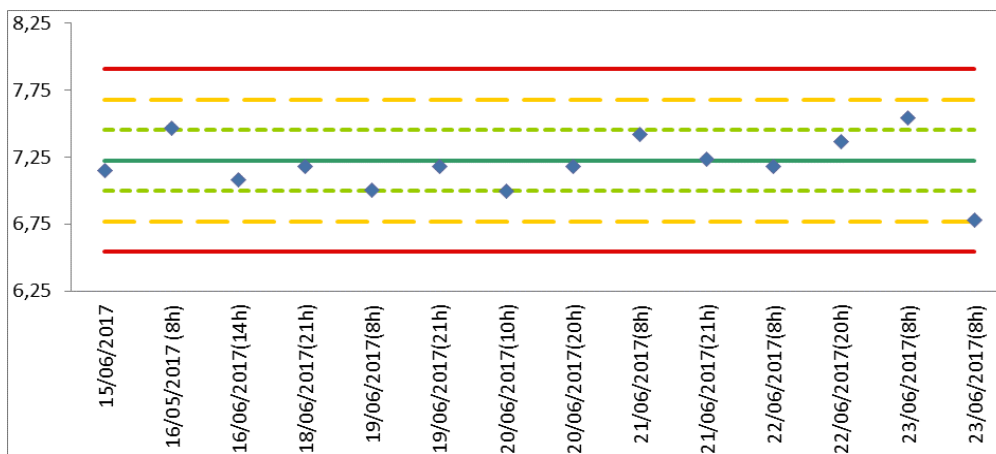


Figure 9: Diagramme de levey-jennings du niveau de concentration 7 log₁₀UI/ml

1.3. Justesse et incertitude

La justesse et les incertitudes ont été évaluées sur la base des résultats de reproductibilité des deux niveaux de concentration (4 et 7 log₁₀IU / ml) en appliquant la formule suivante :

$$\text{Justesse} = \text{Biais en \%} = (m - v) \times 100 / v$$

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Pour le niveau de contrôle 4 log₁₀IU/ml

$$\text{Justesse} = \underline{\underline{-2.10 \%}}$$

- Pour le niveau de contrôle 7 log₁₀IU/ml

$$\text{Justesse} = \underline{\underline{3.20 \%}}$$

Les résultats obtenus sont inférieurs à 15%, seuil d'acceptabilité selon l'EMA (European Medicine Agency 2011).

Les valeurs des incertitudes pour les niveaux de contrôle 4 et 7 log₁₀ IU/ml ont été aussi calculées en utilisant la formule suivante

$$R = \text{valeur mesurée} \pm U \quad (\text{unité})$$

U1 = écart type de la reproductibilité

$$U2 = (E \text{ justesse}) / \sqrt{2} \quad \text{avec } E \text{ justesse} = (m - v)$$

m = moyenne et v = valeur **vraie**

$$\text{L'incertitude combinée (Uc)} = U_c = \sqrt{U1^2 + U2^2}$$

L'incertitude élargie U = 2Uc

- Pour le niveau de contrôle 4 log₁₀ IU/ml

$$U = \underline{\underline{0,916}}$$

- Pour le niveau de contrôle 7 log₁₀ IU/ml

$$U = \underline{\underline{0,978}}$$

1.4. Contamination

Nous avons évalué la contamination inter échantillons en utilisant la formule suivante :

$$\text{Contamination en \%} = \frac{(\mathbf{mB1-mB3})}{(\mathbf{mH-mB3})} \times 100$$

Avec B étant le niveau de contrôle à 4 log₁₀ IU/ml et H le contrôle à 7 log₁₀ IU/ml.

Nous avons obtenu les valeurs suivantes :

mB1 = 4, 33 log IU/ml

mB3 = 4, 43 log IU/ml

mH = 7,80 log IU/ml

Contamination en % = 2,88 %

1.5. Comparaison des méthodes *AmpliX*® (HBV) versus *CobasAmpliPrep*™/COBAS *TaqMan*™ HBV (CAP/CTM HBV)

Pour cela les charges virales de 42 échantillons ont été déterminées par les 2 techniques et les données obtenues ont été comparées.

1.5.1. La charge virale plasmatique par *Cobas AmpliPrep*™/COBAS *TaqMan*™ HBV (CAP/CTM HBV)

La charge virale plasmatique a été déterminée pour l'ensemble des 42 échantillons. Parmi ceux-ci, 34 échantillons ont présenté une charge virale détectable (81,0%, IC95% = 65,9 - 91,4). La moyenne de la charge virale était de 3,93 log UI/ml. La charge virale est répartie selon le tableau suivant :

Tableau V: Charge virale plasmatique des échantillons avec la technique COBAS *TaqMan*™

LOG CV (IU/ml)	Effectif	Pourcentage
Indétectable	8	19,04%
[1.30 -3.30 [18	42,85%
[3.30 – 4.30 [3	7,14%
≥ 4.30	13	30,95%
Total	42	100,0%

1.5.2. La charge virale plasmatique par *AmpliX*® (HBV)

Les 42 échantillons ont été également testés par la technique *AmpliX*® (HBV). Parmi ces 42 35 échantillons (83,3%, IC 95% = 68,6 - 93) ont eu leur ADN viral détectable. La moyenne de la charge virale était de 4,33 log UI/ml. La charge virale est répartie selon le tableau suivant :

Tableau VI: Charge virale plasmatique des échantillons avec la technique *AmpliX*® (HBV)

LOG CV (IU/ml)	Effectif	Pourcentage
Indétectable	7	16,66%
[1.42 -3.30 [15	35,71%
[3.30 – 4.30 [4	9,52%
≥ 4.30	16	38,09%
Total	42	100,0%

1.5.3. Corrélation et concordance entre les 2 techniques

Parmi les 42 échantillons testés (tableau 7), 38 échantillons (90,48%) ont été détectés et 4 (9,52%) étaient indétectables à la fois par les 2 techniques. Cependant le test *Amplix*® a détecté une charge virale chez 4 échantillons (11,4%) alors que la technique *Cobas Taqman*™ ne les a pas détectés. Inversement, la technique *Cobas Taqman*™ a détecté la charge virale chez 3 échantillons (8,8%) non détectés par *Amplix*®.

Tableau VII: Comparaison des charges virales obtenues avec les 2 techniques

		Amplix®				
CAP/CTM™		Indéteçtabl e	[1.42-3.30 [[3.30-4.30 [>=4.30	Total
	Indéteçtable	4	4	0	0	8
	[1.30 -3.30 [3	11	3	1	18
	[3.30 - 4.30 [0	0	0	3	3
	>=4.30	0	0	1	12	13
	Total	7	15	4	16	42

La comparaison a été réalisée en effectuant les tracés de la droite de régression linéaire et le diagramme de Bland-Altman représentés respectivement par les figures 10 et 11.

L'analyse de la régression linéaire entre les 2 techniques Amplix® et Cobas Taqman™ a montré une forte corrélation entre ces 2 tests : $r^2 = 0,927$ et une pente égale à **0,98** [0.86-1.12].

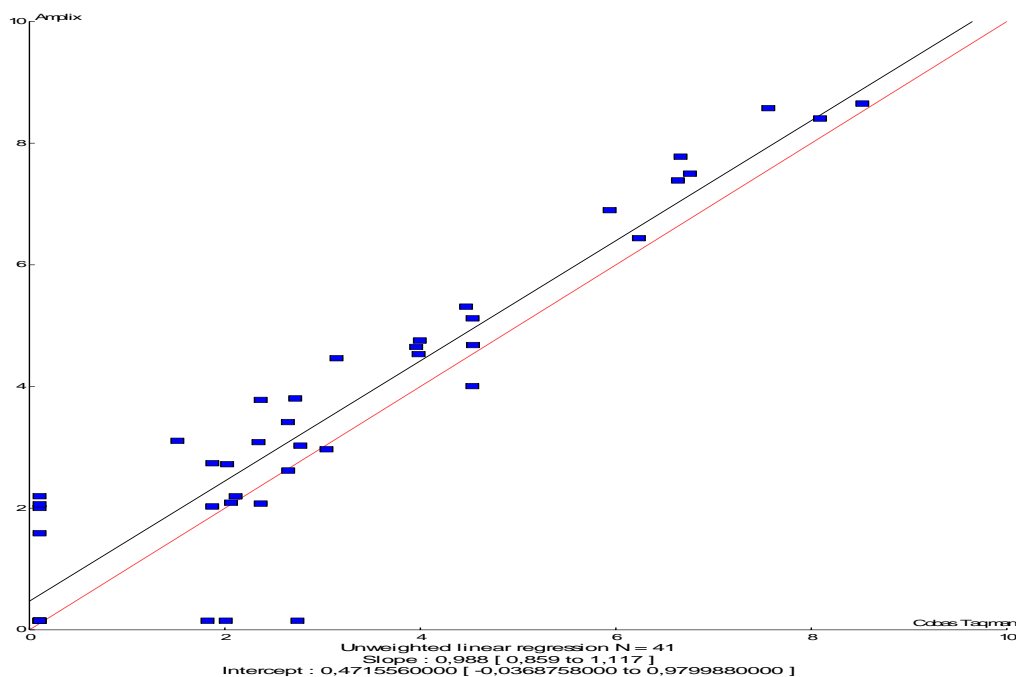


Figure 10: Droite de régression CobasTaqman™ vs Amplix®

Les valeurs de charge virale obtenues par Cobas Taqman sont reportées en abscisse et celles d'Amplix en ordonnée. La discordance entre les 2 méthodes est évaluée par l'écart entre la droite de régression et la bissectrice des axes (ligne d'identité en pointillés).

Le tracé de Bland-Altman a été utilisé pour déterminer le niveau de concordance entre Amplix® et Cobas Taqman™. En utilisant cette méthode, les différences entre les valeurs de log IU/ml de l'ADN du VHB des deux tests ont été tracées par rapport aux moyennes des deux techniques. La moyenne des différences de charge virale entre les 2 techniques est de 0,43 log₁₀ UI/ml (IC = 0,13 - 0,73). Ce biais positif montre une surquantification d'Amplix® par rapport à Cobas Taqman™.

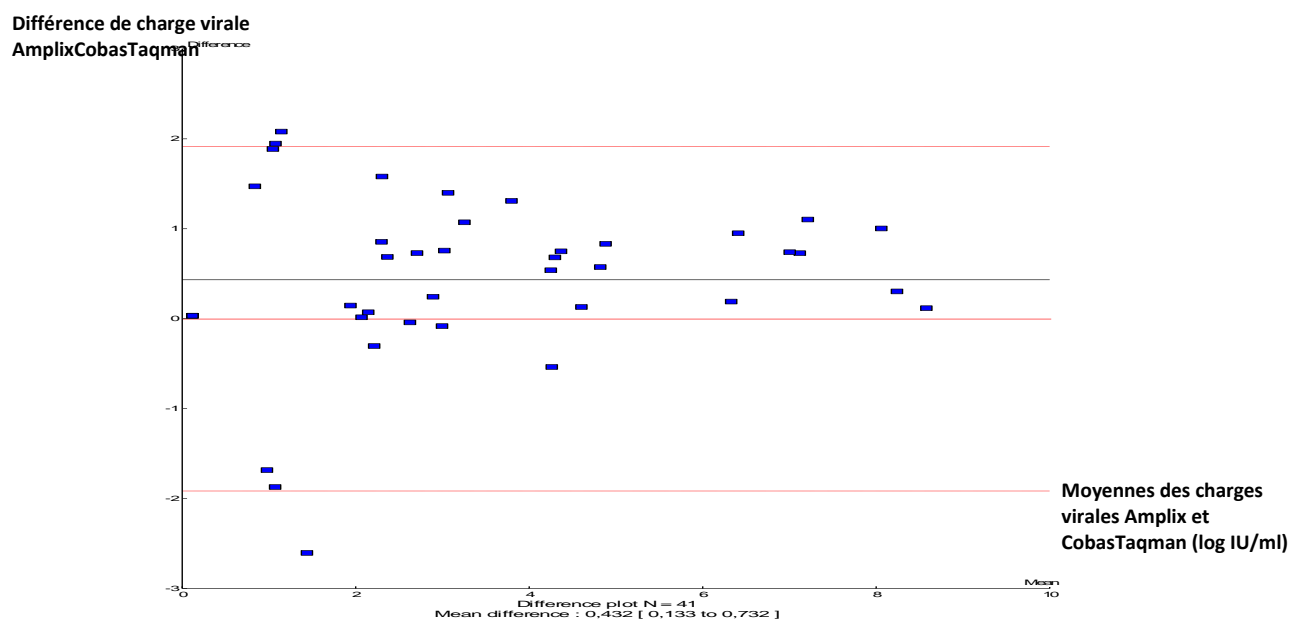


Figure 11: Bland-Altman Amplix® vs CobasTaqman™.

2. Comparaison opérationnelle des 2 techniques

Une comparaison opérationnelle entre les 2 techniques a été réalisée. Leurs différences majeures se situent au niveau de la région cible du génome (Precore et core pour le Cobas Taqman™ et la région X pour l'Amplix®) et du temps de réalisation du test. Les différentes caractéristiques sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau VIII: Comparaison opérationnelle Cobas Taqman™ vs Amplix®

Variables	CAP/CTM v2.0	Amplix®
Principe extraction ADN viral	Particules magnétiques	Particules magnétiques
Prise d'essai (µL)	650 µl	200 µl
Volume d'élution (µL)	65 µl	50 µl
Durée de l'extraction	2h 15 mn	1h 30 mn
Durée de l'amplification	3h 30 mn	1h 40 mn
Région cible du génome	Precore and Core	X
Seuil de détection (IU/mL)	20	26
Intervalle de quantification (IU/mL)	2.00×10^1 to 1.70×10^8	2.60×10^1 to 1.3×10^8
Cout du test	15 000 FCFA	25 000 FCFA

Chapitre IV : Discussion

L'hépatite virale B (VHB) est endémique en Afrique subsaharienne avec des taux de prévalence estimés entre 8 et 20% (**OMS 2013**). La forme chronique peut évoluer insidieusement pendant des années (plus de vingt ans) et se compliquer de cirrhose et de CPF, premier cancer de l'homme sur le continent africain. Ces complications entraînent le décès prématuré de 15 à 25% des malades, faisant des hépatites la deuxième cause de mortalité dans le monde (résolution WHA67.6 de l'Organisation mondiale de la santé [OMS]), et certainement la première cause de décès dans de nombreux pays subsahariens. Plus de 80 % des cas de CPF dans le monde sont causés par une infection virale : le virus B (VHB) dans les deux tiers des cas (**Kodjoh N., 2014**). Ainsi, la quantification plasmatique de l'ADN VHB constitue un outil important pour le suivi de l'évolution de l'hépatite B chronique puisqu'elle reflète directement l'état de la réplication virale. Au-delà du suivi, cette quantification est essentielle dans la prise en charge et le suivi thérapeutique du patient ; elle permet une détection précoce de l'échec thérapeutique suite à l'émergence de mutants de résistance. Un bon suivi de la charge virale permet alors de limiter et prévenir les complications causées par ce virus.

Plusieurs techniques pour la mesure de la charge virale VHB sont actuellement mises sur le marché. Les plus récentes reposent sur l'utilisation de la PCR en temps réel, et leurs performances ont été largement démontrées. Au Sénégal, 2 de ces techniques à savoir *COBAS AmpliPreP™/COBAS Taqman™* (Roche Molecular Diagnostics, Bâle Suisse) et *m2000* (Abbott molecular diagnostics, Wiesbaden, Allemagne) sont couramment utilisées pour effectuer les charges virales du VHB. La technique *AmpliX® (HBV)* constitue une nouvelle plateforme pour la réalisation de la charge virale avec des critères de réalisation du test moins exigeants que ceux des 2 techniques habituellement utilisés au Sénégal. Cependant, aucune étude n'a démontré les performances de cette technique d'où l'intérêt d'entreprendre ce travail sur l'évaluation des performances de la technique, la quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B et de comparer les résultats obtenus avec ceux d'une technique commerciale de référence (*COBAS AmpliPreP™/COBAS Taqman™*). De nombreuses études ont permis de démontrer les performances du *Cobas Taqman™* pour la quantification de l'ADN plasmatique du VHB. C'est ainsi qu'en Allemagne en 2006, l'étude de **Hochberger et collaborateurs** a donné une bonne sensibilité de la technique *Cobas Taqman™* de 10-12 UI/ml et un large intervalle de quantification de 1,74-8,03 log UI/ml. Aussi l'étude menée aux Etats Unis en 2012 par **Pyne et collaborateurs** a démontré une limite de détection de 10,2 UI / ml (intervalle de confiance à 95% = 6,8 à 27,8 UI / ml) (**Pyne M. T. et coll., 2012**).

Dans l'objectif d'une validation de la technique Amplix®, ont été évalués certains paramètres recommandés par le COFRAC (Comité français d'accréditation) pour la validation des techniques quantitatives, à savoir la répétabilité, la fidélité intermédiaire (reproductibilité intra laboratoire), la justesse, l'incertitude, la contamination et la comparaison avec une technique de référence (dans notre cas Cobas Taqman™). Les résultats obtenus ont été favorables : nous avons eu une bonne répétabilité pour les 2 niveaux de concentration faible (CV=2,12%) et élevée (CV=1,60%). Nous avons également obtenu une bonne reproductibilité pour les 2 niveaux de contrôles faible (CV = 6,65%) et élevé (CV = 3,15%). Ainsi la moyenne des coefficients de variation au cours de l'évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité de la technique Amplix®, étaient respectivement de 1,86 % et 4,9% donc inférieurs aux 15% recommandés pour la validation des technologies basées sur la détection des acides nucléiques (**Phillips A. N et coll., 2008**)

L'analyse des performances de la plateforme de PCR Amplix®, sur la quantification de l'ADN du VHB a peu ou pas du tout été menée. Cette analyse de performances a beaucoup plus porté sur la quantification de l'ARN du VIH 1. C'est ainsi que les coefficients de variation issus de la répétabilité et de la reproductibilité de cette étude n'ont pu être comparés qu'à ceux obtenus par **Mossoro-Kpinde et coll.** à Bangui en 2016. Nos CV sont plus faibles que ceux obtenus dans cette étude. **Mossoro-Kpinde et coll** ont eu des coefficients de variation de 7,55% et 6,15% en moyenne respectivement pour la répétabilité et la reproductibilité ; CV inférieurs à 15 % comme recommandé pour les technologies du VIH (**HIV/AIDS Diagnostics, 2015**). Ces résultats permettent de certifier la fidélité et la précision de la technique sur la gamme de quantification ainsi que sa reproductibilité dans le temps et malgré un changement de l'opérateur. De plus, les diagrammes de Levey Jenning ont confirmé ces résultats en montrant une bonne distribution des contrôles au fil du temps. En outre, l'étude de la contamination a démontré que le risque de contamination inter-échantillons était très faible.

Nos résultats de comparaison *Amplix®*, vs *Taqman™* montrent que les mesures de charge virale obtenues avec *Amplix®* corrélaient fortement avec celles de la technique *Taqman™* avec un très bon coefficient de corrélation de 0,927 entre les 2 techniques. Ces résultats sont comparables à ceux publiés en 2016 par **Mossoro-Kpinde et coll. (Mossoro-Kpinde CD. et coll., 2016)**, montrant une corrélation de 0,953 entre ces mêmes techniques lors de l'évaluation des performances de la technique *Amplix®* pour la quantification de l'ARN du VIH 1 à partir de 215 plasmas de sujets infectés au VIH 1 de sous types B et non B.

L'analyse de la concordance a donné un biais de 0.43 ce qui montre une légère sous quantification de la technique *Taqman*TM par rapport à la technique *Amplix*® ; les niveaux d'ADN du VHB déterminés par le test *Amplix*® étaient sensiblement plus élevés. Selon le protocole du fabricant, le seuil de détection du test *Amplix*® (26 UI / mL) est plus élevé que celui du *Taqman*TM (20 UI / mL). Pour ce qui est de cette sous quantification de l'ADN viral, il existe plusieurs facteurs possibles qui peuvent influencer les résultats de la quantification. Parmi ces facteurs les mutations dans les régions promotrices du précore et du core qui peuvent se produire au fur et à mesure de la progression de la maladie (**Yong Huang et coll., 2015 ; Ming-Lun Yeh et coll., 2014**).

Ming et coll. (Ming-Lun Yeh et coll., 2014) ont démontré dans leur étude un ADN viral indétectable par Cobas TaqmanTM chez des sujets présentant la mutation tyrosine-méthionine-aspartate-aspartate (YMDD), qui confère une résistance à la lamivudine. Le test de PCR *Amplix*® permet une détection précise des génotypes A à H et la quantification de l'ADN viral par ce kit n'est pas impactée par les mutants pré-core. En outre, une étude réalisée au Japon a montré que le génotype B et une charge virale du VHB <3log₁₀ IU/mL étaient deux facteurs qui ont contribué à une différence significative entre les techniques Abbott Real time® et Cobas TaqmanTM dans la détection de la charge virale de l'ADN du VHB (**Yeh ML. Et coll., 2014**). Une limite de notre étude est la non réalisation du génotypage qui aurait permis la détermination de différents génotypes et les possibles mutations du virus chez ces patients.

La méthode de PCR en temps réel *Amplix*® s'avère satisfaisante de par son efficacité, sa répétabilité, sa reproductibilité et sa précision. De plus, cette technique est plus simple par rapport à la technique *Taqman*TM du point de vue réalisation ; en effet elle nécessite une durée d'analyse plus courte. La durée totale de l'analyse d'une série est de 3 heures 10 minutes (1 h 30 pour l'extraction et 1 h 40 pour l'amplification) sur *Amplix*® *versus* 5 heures 45 minutes (2 h 15 pour l'extraction et 3 h 30 pour l'amplification) pour CAP / CTM *TaqMan*TM (Roche Molecular Diagnostics).

Du point de vue nombre d'échantillons utilisés pour une série, la technique *Amplix*® présente l'avantage de disposer d'un système d'extraction adaptable de 1 à 16 échantillons par cycle avec un workflow entièrement adapté aux laboratoires intermédiaires. La plateforme CAP/CTM *TaqMan*TM traite plus d'échantillons avec des séries de 4 à 72 échantillons par cycle. La plateforme de PCR en temps réel *Amplix*® est moins encombrante vu l'espace occupé. En effet la conception compacte (21× 48 ×31 cm) du thermocycleur *Amplix*® NG permet de rapprocher plusieurs thermocycleurs contrôlés simultanément par un ordinateur

afin d'augmenter la productivité pour un minimum d'espace. Enfin cette technique amplifie une région du génome du virus de l'hépatite B plus conservée et donc moins sujette à la survenue de mutations.

Conclusion

Les tests de quantification de l'ADN du VHB constituent un élément clé de la prise en charge de l'hépatite chronique B. Ils permettent d'établir la sévérité de l'infection et le pronostic des hépatites chroniques à virus sauvage ou mutant. Ils sont également utiles pour l'indication du traitement et le suivi des patients traités. Les progrès de la biologie moléculaire ont conduit au développement de tests de plus en plus accessibles de par le nombre réduit d'échantillons exigés pour une série de tests. C'est dans ce contexte que nous avons été amenés à vérifier les performances sur site de la technique de PCR en temps réel *AmpliX® (HBV)* en comparaison avec la technique *Cobas AmpliPrep™/Cobas TaqMan™ HBV* avant son utilisation à large échelle. Cette étude a été menée au laboratoire du Centre Médical Inter Armées (CMIA) de Dakar et à l'unité de Biologie Moléculaire du Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Aristide Le Dantec. Le travail a été réalisé à partir de 42 échantillons de plasma de sujets porteurs chroniques du VHB.

Pour la technique *AmpliX®*, à partir de 2 niveaux de concentration (fort et faible) du kit d'amplification, nous avons évalué certains critères de performance recommandés par le COFRAC (Comité français d'accréditation) pour la validation des techniques quantitatives, à savoir la répétabilité, la fidélité intermédiaire (reproductibilité intralaboratoire), la justesse, l'incertitude, la contamination. Par la suite pour la comparaison, la charge virale a été réalisée sur les 42 échantillons qui ont ensuite été retestés avec la technique de référence *Cobas AmpliPrep™/Cobas Taqman™ HBV*.

Cette évaluation a fourni des résultats favorables pour la répétabilité et la reproductibilité avec des coefficients de variations inférieurs au seuil recommandé pour la validation des technologies à base d'acides nucléiques, et une incertitude montrant une faible marge d'imprécision. En outre, l'étude de la contamination a démontré un faible risque de contamination inter-échantillons.

La comparaison de la technique *AmpliX®* avec la technique *Cobas AmpliPrep™/Cobas Taqman™* a montré un coefficient de corrélation ($r= 0.927$) avec une moyenne de 0,43 entre les différences de charge virale des 2 techniques. Ce biais positif montre une légère sur-quantification des valeurs de charge virale de la technique *AmpliX®* par rapport à la technique *Cobas Taqman™*.

En résumé La méthode de PCR en temps réel Amplix® s'avère satisfaisante de par son efficacité, sa répétabilité, sa reproductibilité et sa précision. Une bonne corrélation et une bonne concordance avec la technique Cobas Taqman™ ont aussi été notées. De plus, les séries de test sont faisables avec un nombre moindre d'échantillons et réalisées avec un délai d'exécution plus court que pour les techniques classiques. Ainsi une interchangeabilité entre ces 2 techniques peut être acceptée et la plateforme de PCR en temps réel Amplix® considérée comme un système fiable pour la surveillance des patients atteints d'hépatite chronique B.

Références bibliographiques

Alice T, Cerutti F, Pittaluga F, Varetto S, Gabella S, Marzano A, Franchello A, Colucci G, Ghisetti V. "Cobas Ampliprep-Cobas Taqman Hepatitis B Virus (Hbv) Test: A Novel Automated Real-Time Pcr Assay for Quantification of Hbv DNA in Plasma." *J Clin Microbiol*, 2007; 45(3), 828-34

Andre F. *Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa.* Vaccine 2000 ; 18 Suppl 1: S20-2.

Andrisani O. M. "Deregulation of epigenetic mechanisms by the hepatitis B virus x protein in hepatocarcinogenesis." *Viruses* 2013 5(3): 858-872.

Antona D, Larsen C. "Epidémiologie de l'hépatite B en France". *Virologie* 2010, 14 (supplément 1):S23-S34.

Asabe S, Wieland S.F, Chattopadhyay P.K, Roederer M, Engle RE, Purcell RH, Chisari FV. "The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection." *J Virol* 2009, 83(19): 9652-62.

Bartenschlager R, Schaller H. "The Amino-Terminal Domain of the Hepadnaviral P-Gene Encodes the Terminal Protein (Genome-Linked Protein) Believed to Prime Reverse Transcription". *EMBO J.*, 1988, 7: S, 4185–4192.

Bazin H. "L'histoire des vaccinations". John Libbey Eurotext 2008.

Bekondi C. "Aspects Cliniques Et Épidémiologiques Des Infections À Virus De L'hépatite B En République Centrafricaine.," Ecole doctorale "Biologie, Santé, environnement. 2008 Université Henri Poincaré-Nancy 1, 157.

Belnap D.M, Watts N.R, Conway J.F, Cheng N, Stahl SJ, Wingfield PT, Steven AC. "Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus". 2003 Sep 16; 100(19):10884-9. Epub 2003 Sep 3.

Billioud G, Ait-Goughoulte M, Zoulim F. "Cycle de réplication du VHB et molécules antivirales". *Virologie*, juillet 2010, Volume 14, 57-73. DOI: 10.1684/vir.2010.0301.

Block T.M, Mehta A.S, Fimmel C.J, Jordan R. "Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma". *Oncogene*, 2003, 22:5093-5107.

Blumberg B.S. Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI « A Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrome Leukemia and Hepatitis » *Annals of Internal Medicine*, 1967, p. 924-31.

Bock C. T, Schwinn.S, Locarnini S. Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, Zentgraf H. "Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome". *J Mol Biol* 307, 2001, 183-196.

Boesecke C, Wasmuth JC. "Hepatitis B". In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H, editors. *Hepatology 2013: a clinical textbook*. 4. Germany: Flying Publisher; 2013. pp. 34–45.

Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S and Paterlini-Brechot P "Persistent Hepatitis B Virus Infection in Subjects without Hepatitis B Surface Antigen: Clinically Significant or Purely "Occult"?" *Hepatology*, 2001; 34(1), 194-203.

Carole Emile. "Sérologie spécifique de l'Hépatite B [Antigènes(Hbs) ; AgHbs] ". 15-01-2007.

Castera, L. "Tests De Quantification Virale Pour Le Virus De L'Hépatite B ". *Hépatogastro* 2004, 11(2), 99-103.

Cha M. Y, Ryu D. K, Jung HS, Chang HE, Ryu WS "Stimulation of hepatitis B virus genome replication by HBx is linked to both nuclear and cytoplasmic HBx expression." *J Gen Virol* 2009 **90**(Pt 4): 978-986.

Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M, Piratvisuth T, Cornberg M, Brunetto MR, Tillmann HL, Kao JH, Jia JD, Wedemeyer H, Locarnini S, Janssen HL, Marcellin P. "Hepatitis B surface antigen quantification: Why and how to use it in 2011. A core group report". *J Hepatol* 2011; 55:1121-31.

Chang MH «*Hepatitis B virus infection*», *Semin Fetal Neonatal Med*, vol. 12, n° 3, 2007, p. 160–7 [lien PMID lien DOI]

Chang C, Zhou S, Ganem D, Standring DN *Phenotypic mixing between different Hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cis preferential.* *J Virol.* 1994 August; 68(8): 5225–5231. PMID: PMC236466.

Chemin I, Zoulim F. "*Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma*". *Cancer Letters* 2009; 286: 52–59.

Chen C. J, Yang H. I, Su J, Jen C. L, You S. L, Lu S. N, Huang GT, Iloeje UH; REVEAL-HBV Study Group. "*Risk of Hepatocellular Carcinoma across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level.*" *JAMA*, 2006; 295(1), 65-73.

Ciotti M, Marcuccilli F, Guenci T, Prignano M. G. and Perno C. F. "*Evaluation of the Abbott Realtime Hbv DNA Assay and Comparison to the Cobas Ampliprep/Cobas Taqman 48 Assay in Monitoring Patients with Chronic Cases of Hepatitis B.*" *J Clin Microbiol*, 2008 46(4), 1517-9

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. « *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis* ». *Lancet*, vol. 1, no 7649, 1970, p. 695–8 PMID 4190997.

Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R. "*Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for clinicians*". In *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 2012 2(4): 353-365

Davis L. G, Weber D. J. and Lemon S. M. "*Horizontal Transmission of Hepatitis B Virus.*" *Lancet*, 1989. 1(8643), 889-93.

Denis F. "*L'éradication de l'hépatite B en Europe est-elle possible?*" *Méd Thérap Pédiatr*, 2001 4: 30-35

Dienes H. P, Purcell R. H, Popper H. and Ponzetto A. *"The significance of infections with two types of viral hepatitis demonstrated by histologic features in chimpanzees"*. J Hepatol 1990). 10, 77-84.

Dienstag J L, *"Hepatitis B Virus Infection"*. Review article. N Engl J Med; 2008; 359:1486-500.

Diop F. *"CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES VIRALES DE L'HEPATITE B AU SENEGAL : DANS LE CADRE DU PROJET PROLIFICA (étude préliminaire) "* Mémoire de Master en Microbiologie Fondamentale et Appliquée Université Cheikh Anta DIOP Dakar 2018 N°35/2018

Dryden K.A, Wieland S.F, Whitten-Bauer C, Gerin JL, Chisari FV, Yeager M *"Native Hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy"*. Mol Cell, 2006, 22:843–850.

Ducancelle A, Pivert A. et Lunel-Fabiani F. *"Les mutants précore et du promoteur basal du core du virus de l'hépatite B"*. Virologie, 2011; 15(2):100-14.

European Association for the Study of the Liver (EASL) *"Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B"*. J Hepato 2012; 57:167-185.

Fallot G, Neuveut C, Buendia MA. *"Diverse roles of hepatitis B virus in liver cancer."* Curr Opin Virol 2012 2(4): 467-473.

Fattovich G. *"Natural history and prognosis of hepatitis B"*. Seminars in Liver Disease 2003, 23: 47-58.

Fujii H., Moriyama K., Sakamoto N, Kondo T, Yasuda K, Hiraizumi Y, Yamazaki M, Sakaki Y, Okochi K, Nakajima E. *"Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus"*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1992, 184: 1152-1157.

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P and Charnay P. "Nucleotide Sequence of the Hepatitis B Virus Genome (Subtype Ayw) Cloned in *E. Coli*." *Nature* 1979, 281(5733), 646-50.

Gallagher K.M., Novak R.T. "Hepatitis, *Viral Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA*". *International Encyclopedia of Public Health*. 2008, Pages 374–382.

Ganem D., Schneider R.J. "Hepadnaviridae: Les virus et leur répllication". Knipe DM et al, eds. *Fields Virology*, 4 e éd. Philadelphie, Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2923-2969.

Ganem D., Prince A.M. "Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences". *N Engl J Med* 2004, 350:1118-1129.

Gilbert R. J, Beales L, Blond D, Simon MN, Lin BY, Chisari FV, Stuart DI, Rowlands DJ. "Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral." *Proc Natl Acad Sci USA* 2005. **102**(41): 14783-14788.

Glebe D., Urban S. "Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry". *World J Gastroenterol* 13, 2007, 22-38.

Grenier B, Dubreuil M, Journois D. "Comparison of two measurement methods: the Bland and Altman assessment". *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. 2000;19(2):128-35. Epub 2000/03/24.

Guide des vaccinations 2003. sante.gouv.fr/htm/dossiers/vaccins2003/3vaccin.htm.

Hézode C. "Actualités Hépatite Chronique B." Hôpital Henri Mondor -Créteil, 2011. http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011-janvier/VHB-Desc-janv2011-hezode.pdf

Hochberger S, Althof D, Gallegos de Schrott R, Nachbaur N, Rock H, and Leying H. "Fully Automated Quantitation of Hepatitis B Virus (Hbv) DNA in Human Plasma by the Cobas Ampliprep/Cobas Taqman System." *J Clin Virol*, 2006; 35(4), 373-80.

Hollinger J. B., Liang T. J. *"Hepatitis B Virus"*. In Knipe DM et al., eds. *Fields Virology* 4th ed. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins. 2001: 2971-3036.

Hézode, C. *"Actualités Hépatite Chronique B."* Hôpital Henri Mondor -Créteil, http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_2011.desc/2011-janvier/VHB-Desc-janv2011-hezode.pdf

Institut de veille sanitaire (INVS) *"Estimation du nombre annuel de nouvelles infections par le virus de l'hépatite B en France", 2004-2007*

Jack A. D., Hall A.J., Maine N. Mendy M, Whittle HC. *"What Level of Hepatitis B Antibody Is Protective?"* *J Infect Dis* 1999, 179(2), 489-92.

Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW; HBV 99-01 Study Group; Rotterdam Foundation for Liver Research. *"Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg positive chronic hepatitis B: a randomised trial"*. *Lancet* 2005; 365: 123-29

Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, Deterding K, Schlue S, Raupach R, Flisiak R, Bock CT, Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. *"Hepatitis B surface antigen [HBsAg] levels in the natural history of hepatitis B virus [HBV]-infection : a European perspective"*. *J Hepatol* 2010 ; 52 : 514-22.

Kann M., Schmitz A., Rabe B. *"Intracellular transport of hepatitis B virus"*. *World J Gastroenterol* 13, 2007, 39-47.

Kao J-H, Liu C-J, Jow G-M, Chen P-J, Chen D-S, Chen B-F. *"Fine mapping of hepatitis B virus pre-S deletion and its association with hepatocellular carcinoma"*. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. oct 2012;32(9):1373- 1381.

Kassab S. *"Variabilité du virus de l'Hépatite B"* Thèse de doctorat en Sciences de la Santé et de la vie Université de Bordeaux 2014

Kew M. C. "Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma." *J Gastroenterol Hepatol* 2011 **26 Suppl 1**: 144-152.

Kew M. C. "Epidemiology of Chronic Hepatitis B Virus Infection, Hepatocellular Carcinoma, and Hepatitis B Virus-Induced Hepatocellular Carcinoma." *Pathol Biol (Paris)* 2010, 58(4), 273-7.

Kidd-Ljunggren K., Miyakawa Y., Kidd AH. "Genetic variability in hepatitis B viruses". *The Journal of general virology* 2002, 83(Pt 6): 1267-1280.

Kock J., Borst E.M., Schlicht H. J. "Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment". *J Virol* 70, 1996, 5827-5831.

Köck J. and H.J Schlicht. "Analysis of the Earliest Steps of Hepadnavirus Replication: Genome Repair after Infectious Entry into Hepatocytes Does Not Depend on Viral Polymerase Activity." *J Virol*, 1993 67(8), 4867-74.

Kodjoh N, Wadagni A. A. C, Saké Alassan K, Kpoussou A. R , Vignon R. K, Houinato D. "Pratique des médecins généralistes en matière de dépistage de l'hépatite virale B en République du Bénin" *Journal Africain d'Hépatogastroentérologie* December 2014, Volume 8, Issue 4, pp 178–182|

Konaté A. "Épidémiologie de l'infection par le Virus de l'hépatite B en Afrique" In *Développement et santé. Développement et Santé* 2012 ; 200 : 11-17

Krajden M, McNabb G, Petric M. "A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (Acip) Part 1: Immunization of Infants, Children, and Adolescents." *MMWR Recomm Rep* 2005, 54(RR-16), 1-31

Kramvis A., Arakawa K, Yu M. C, Nogueira R, Stram D. O. and Kew M. C. "Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus." *J Med Virol* 2008 80(1): 27-46.

Lai C.L, Yuen M.F. *"The natural history and treatment of chronic hepatitis B: a critical evaluation of standard treatment criteria and end points"*. Ann Intern Med 2007; 147: 58-61.

Lanford R. E, Chavez D, Rico-Hesse R and Mootnick A. *"Hepadnavirus infection in captive gibbons"*. J Virol 2000.74, 2955-9.

Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, Gane E, Fried MW, Chow WC, Paik SW, Chang WY, Berg T, Flisiak R, McCloud P, Pluck N; Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B Study Group. *"Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg positive chronic hepatitis B"*. N Engl J Med 2005; 352: 2682-95.

Le Duff Y, Blanchet M and Sureau C *"The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent."* J Virol 2009; 83(23): 12443-51.

Lepère-Douard C. *"Analyse du mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite B : Identification d'un nouveau déterminant de l'infectivité"*. Cellular Biology. Université Rennes 1, 2009.

Leprêtre A, Ba I, Lacombe K, Maynard M, Toufik A, Ndiaye O, Kane CT, Gozlan J, Tine J, Ndoye I, Raguin G, Girard PM *"Prevalence and behavioural risks for HIV and HCV infections in a population of drug users of Dakar, Senegal": the ANRS 12243 UDSEN study.* J Int AIDS Soc [Internet]. 22 mai 2015 [cité 6 août 2015];18(1). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442125/>

Liaw YF, Chu CM. *"Hepatitis B virus infection"*. Lancet 2009, 373(9663): 582-592.

Liu C J, Chen P. J, Lai M. Y, Lin F. Y, Wang T, Kao J. H. and Chen D. S. *"Viral Factors Correlate with Hepatitis B E Antigen Seroconversion in Patients with Chronic Hepatitis B."* Liver Int, 2006; 26(8), 949-55.

Lok AS, McMahon BJ. *"Chronic hepatitis B"*. Hepatology 2007; 45: 507-39.

Lucifora J. " *Etude de la répllication du virus de l'hépatite B et de la réponse intracellulaire à l'infection virale*". Thèse de doctorat. Lyon I Université CLAUDE BERNARD. 2008 N°211 2008

Lunel-Fabiani F, Ducancelle A. " *Traitement des hépatites B, C, D*". Revue Développement et Santé 2012; N° 200.

Lurman A. " *Eine icterus epidemic. (In German)* ". Berl Klin Wochenschr 1885, 22:20–3.

MacCallum F.O. " *Homologous serum hepatitis*". Lancet 2 1947, 691.

Marcellin P, Buti M, Gane EJ, Krastev Z, Flisiak R, Germanidis G et al. " *Five years of treatment with tenofovir DF (TDF) for chronic hepatitis B (CHB) infection is associated with sustained viral suppression and significant regression of histological fibrosis and cirrhosis*". Hepatology 2011; 54:1011A.

Mast E E, Margolis H S, Fiore A E, Brink EW, Goldstein ST, Wang SA, Washington MK, Barnes CN, Flaherty JF, Bornstein JD, McHutchison JG, Heathcote EJ" *A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (Acip) Part 1: Immunization of Infants, Children, and Adolescents.*" MMWR Recomm Rep 2005, 54(RR-16), 1-31.

Maura Dandri, Jörg Petersen. " *HBV*". Virology. Hepatology. 575 p. P 68-87, 2013, Flying Publisher.

Mazet A.A. " *Etude des souches du virus de l'hépatite B dans les compartiments sérique et leucocytaire chez des patients présentant une infection B occulte et chez des témoins*". Thèse de doctorat en Biologie Sciences Santé. Université de Limoges. 2006. N°258.

Ming-Lun Yeh, Chung-Feng Huang, Ching-I Huang, Shu-Fen Liu, Hua-Ling Yang, Ming-Yen Hsieh, Jee-Fu Huang, Chia-Yen Dai, Wan-Long Chuang, and Ming-Lung Yu. "Abbott RealTime HBV Assay Is More Sensitive in Detection of Low Viral Load and Little Impacted by Drug Resistant Mutation in Chronic Hepatitis B Patients under Nucleot(s)ide Analogues Therapy" *PLoS One*. 2014; 9(7): e101790. PMID: 25000502

Milich DR, Chen MK, Hughes JL and Jones J. E. "The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence". *J immunol*. 1998 Feb 15; 160 (4):2013-21.

Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney A. K and McLachlan A "Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? " 1990 Sep; 87(17):6599-603.

Miller R. H. and W. S. Robinson "Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses." *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(8): 2531-2535.

Ministère de la Santé et des Services sociaux *Guide d'intervention sur l'hépatite B* - Janvier 2014 - 2^e édition 13-271-08W ; 978-2-550-69837-1

Modi AA, Feld JJ. "Viral hepatitis and HIV in Africa. *AIDS Rev*. 2007;9(1):25–39". [PubMed]

Mossoro-Kpinde CD , Mboumba Bouassa RS , Jenabian MA , Wolyec ST , Robin L , Matta M, Longo JD, Grésenguet G, Andreoletti L, Bélec L. "Performances analytiques de la plateforme de PCR en temps réel Amplix® à base d'ARN de type 1 pour l'immunodéficience humaine pour la quantification de l'ARN du VIH-1" *AIDS Res Treat*. 2016; 2016: 7954810. doi: 10.1155 / 2016/7954810. Epub 2016 5 déc.

Nagalo B.M. "Sécurité transfusionnelle au Burkina Faso: Séroprévalence et incidence des virus de l'immunodéficience humaine (VIH), des hépatites B & C (VHB et VHC) et de *Treponema pallidum* chez les donneurs de sang " Thèse de doctorat en Sciences Biologiques Appliquées Option Biologie Moléculaire. Université d'Ouagadougou 2012

Nassal, M. "*B viruses: reverse transcription a different way*". Hepatitis Virus Res 134, 2008, 235-249.

Newbold J. E, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S "*The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes*". J Virol 69, 1995, 3350-3357.

Nora M. "*Variabilité génétique du virus de l'hépatite B et implication sur le diagnostic et la pathogénèse*". Thèse de doctorat en Biologie. Lyon I. Université CLAUDE BERNARD. 2012. N°026/2012.

Norder H, Courouce A. M, Coursaget P, Echevarria J. M, Lee S. D, Mushahwar I. K, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. "*Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes.*" Intervirology 2004 47(6): 289-309.

Olinger C.M, Prapan Jutavijittum, Judith M. H, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T, Toriyama K, Muller CP. "*Possible New Hepatitis B Virus Genotype, Southeast Asia.* Emerging Infectious Diseases, November 2008, Volume 14, Number 11.

OMS. "*Hépatite B*". Aide-mémoire N°204 Juillet 2017

OMS. *Relevé épidémiologique hebdomadaire* Juillet 2017 N° 27, 2017, 92

OMS. "*Virus de l'hépatite B*". Centre des médias Hépatite B Aide-mémoire N°204 Juillet 2013.

OMS. "*Hépatite B.*" Aide-mémoire N°204 2012.

Organisation mondiale de la santé. "*Hépatite B*". Aide-mémoire 204 Mise à jour en 2008.
Organisation mondiale de la Santé "*Hépatite B*" Aide-mémoire N° 204 2000

Parlier D. "*Dépistage et diagnostic des hépatites*". Les entretiens de Bichat. 2013

Patient R, Hourieux C, Roingeard P "*Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles.*" *Cell Microbiol* 2009; 11(11): 1561-1570.

Pawlotsky J M. "*Les techniques virologiques de diagnostic et de suivi de l'hépatite B.*" *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2008 ; 32 : 56-63. PMID: PMC252719.

Pierre Aubry, Bernard-Alex Gaüzère "*Les cancers dans les pays en développement. Médecine Tropicale*". Mise à jour le 16/01/2018

Phillips A. N, Pillay D, Miners H.A, Bennett D. E, Gilks C. F. and. Lundgren J. D "Outcomes from monitoring of patients on antiretroviral therapy in resource-limited settings with viral load, CD4 cell count, or clinical observation alone: a computer simulation model," *The Lancet*. 2008; vol. 371, no. 9622, pp. 1443–1451.

Pol S. "*Le traitement de l'hépatite B, stratégie actuelle*". 2006. www.snfge.org/01-bibliothèque/oj-séminaire...

Pol J, Soussan P, Garreau F, Arnulf B, Pol S, Kremsdorf D "*Implication de la protéine HBSP du virus de l'hépatite B dans la pathogénèse virale*". *Virologie*, 2005; 9 (2):115-66.

Pollack JR, Ganem D. "*An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation*". *J Virol* 1993, **67**:3254-3263.

Pyne M. T, Vest L, Clement J, Lee J, Rosvall J. R, Luk K, Rossi M, Cobb B, Hillyard DR. "Comparison of Three Roche Hepatitis B Virus Viral Load Assay Formats." 2012 *J Clin Microbiol*, 50(7), 2337-42.

Rabe B, Delaleau M, Bischof A, Foss M, Sominskaya I, Pumpens P, Cazenave C, Castroviejo M, Kann M. "*Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids*". *PLoS Pathog* 5, 2009, e1000563.

Radziwill G, Tucker W, Schaller H. "*Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity.*" *J Virol*, 1990, 64(2): 613-20.

Rapport du groupe de travail du Conseil supérieur d'hygiène publique de France
"Risque de contamination horizontale au sein de collectivité d'enfants en cas de présence d'un porteur du virus de l'hépatite B (VHB) et opportunité de vacciner la population contact"
septembre 2005

Roingeard P. *"La culture du virus de l'hépatite B vitro"*. Médecine/sciences 1992; 8:61-2.

Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A. and W. H. O. Collaborative Study Group. *"An International Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis B Virus DNA Nucleic Acid Amplification Techniques."* Vox Sang, 2001; 80(1), 63-71.

Sall Diallo A, Sarr M, Fall Y, Diagne C, Kane MO. *"Etude de l'infection par le virus de l'hépatite virale B dans la population infantile au Sénégal"*. Dakar Med. 2004;49(2):136–142. [PubMed]

Samira Fafi-Kremer, Jean-Pierre Zarski *"Quels examens prescrire chez un malade antigène HBs positif ?"* Gastroentérologie Clinique et Biologique Vol 29, N° 4 - avril 2005 pp. 364-368 Doi : GCB-04-2005-29-4-0399-8320-101019-200513268

Schaefer S. *"Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes."* World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 14-21.

Schaefer S. *"Hepatitis B virus: significance of genotypes"*. J Viral Hepat 2005, 12(2): 111-124.

Schlicht H.J, Salfeld J, Schaller H. *"The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation"*. J Virol, 1987; 61:3701-9.

Seeger C, Mason W, Zoulim F. *"Hepadnaviruses"*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007

Seeger C. MB, Zoulim F. *"Hepadnaviruses"* 2006.

Servant-Delmas A, Mercier M, Girault A. et Laperche S. *"Impact clinique, thérapeutique et diagnostique de la diversité génétique du virus de l'hépatite B"*. *Virologie*, Juillet-Août 2007, Volume 11, Numéro 4, 297-307. DOI : 10.1684/vir.2007.0101.

Sobao Y, Tomiyama H, Sugi K, Tokunaga M, Ueno T, Saito S, Fujiana S, Morimoto M, Tanaka K, and Takiguchi M. *"The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication"*. *J Hepatol* 2002, 36:105-115

Soussan P, Carreau F, Zylberberg, Fen·ay C, Brechot C, Kremsdorf D. *"In vivo expression of a new hepatitis B virus prote in encodecl by a spliced RNA"*. *j Clin Invesl* 2000 ; 1 05: 55-60.

Stahl M, Beck J, Nassal M. *"Chaperones activate hepadnavirus reverse transcriptase by transiently exposing a C-proximal region in the terminal protein domain that contributes to epsilon RNA binding."* *J Virol*, 2007, 81(24): 13354-64.

Stanislas Pol *"Épidémiologie et histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B"*
Infection Unité d'Hépatologie et Inserm U-567, Hôpital Cochin, Paris R Hépatogastro, septembre 2007 vol. 14, numéro spécial

Summers J, Mason WS. *"Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate"*. *Cell*.1982 Jun; 29(2):403-415. [PubMed]

The lancet. « *Hepatitis B vaccine* » Vol 2, n° 8206, 1980,p. 1229–30 PMID 6108398

Thibault V, Benhamou Y, Seguret C, Bochet M, Katlama C, Bricaire F, Opolon P, Poynard T, Agut H. *"Hepatitis B Virus (HBV). Mutations Associated with Resistance to Lamivudine in Patients Coinfected with HBV and Human Immunodeficiency Virus"*. *J. Clin. Microbiol*, 1999, 37: 3013-3016.

Tiollais P, Pourcel C, DeJean A. *"The hepatitis B virus"*. Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France : *Nature* 317, 10 October 1985, p.489 - 495 (); doi:10.1038/317489a0, INSERM U163, CNRS LA 271.

Toh S T, Jin Y, Liu L, Wang J, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Ronaghi M, Toh HC, Chow PK, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. *"Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations"*. Carcinogenesis 2013 34, 787–798

Trépo C, Zoulim F, Alonso C, Petit MA, Pichoud C, Vitvitski L *"Diagnostic markers of viral hepatitis B and C"*. Out 1993, 34: S20-S25.

UNITAID, HIV/AIDS Diagnostics Technology Landscape, UNITAID, 5th edition, 2015.

Urban S, Schulze A, Dandri M. Petersen J *"The replication cycle of hepatitis B virus"*. 2010 Feb; 52(2):282-84.

Van Bommel F. et al. *"HBV Virology"*. Hepatology 2013. Flying Publisher, 2013: 575 p. Pages 133-169.

Venard V, Corsaro D, Kajzer C, Bronowicki JP, Le Faou A. *"Hepatitis B virus X gene variability in French-born patients with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma"*. J. Med. Virol, 2000, 62: 177-184.

Vray M, Debonne JM, Sire JM. Tran N, Chevalier B, Plantier JC, Fall F, Vernet G, Simon F, Mb PS. *"Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Dakar, Senegal"*. J Med Virol, 2006; 78:329-34.

Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I and Blum H. E. *"Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo"*. Hepatology 1996. 24, 1-5.

Wang GH, Zoulim F, Leber EH, Kitson J, Seeger C *"Role of RNA in enzymatic activity of the reverse transcriptase of hepatitis B viruses"*. J Virol 1994, 68:8437-8442.

Wasley A, Grytdal S, Gallagher K. *"Surveillance for acute viral hepatitis--United States"*. MMWR Surveill Summ, 2008; 57:1-24.

Weber B. "Genetic variability of the S gene of hepatitis virus: clinical and diagnostic impact". J Clin Virol 2005; 32:102-12.

Weber M., Bronsema V., Bartos H, Bosserhoff A, Bartenschlager R, Schaller H "Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription". J Virol 68, 1994, 2994-2999.

World Gastroenterology Organisation. "Hepatitis B". Septembre 2008, Practice Guideline

Yamaura T, Tanaka E, Matsumoto A, Rokuhara A, Orii K, Yoshizawa K, Miyakawa Y. and Kiyosawa K. "A Case-Control Study for Early Prediction of Hepatitis B E Antigen Seroconversion by Hepatitis B Virus DNA Levels and Mutations in the Precore Region and Core Promoter." J Med Virol, 2003; 70(4), 545-52.

Yang G, Liu A, Xie Q, Guo TB, Wan B, Zhou B, Zhang JZ. "Association of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B". Int Immunol 2007;19:133-40.

Yong Huang, Haijun Deng, Zhi Peng, Yao Huang, Quanxin Long and Ailong Huang "Mutations of Basal Core Promoter and Precore Regions in Hepatitis B Virus Genotypes B and C Hepat Mon". 2015 Jan; 15(1): e23034. PMCID: PMC4344649 PMID: 25741368

Yeh ML, Huang CF, Hsieh MY, Huang JF, Dai CY, Yu ML, Chuang WL. "Comparison of the Abbott RealTime HBV assay with the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV assay for HBV DNA detection and quantification". J Clin Virol 2014;60:206-14

Zeng G, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J, Tan D, Xiao F, Ma S, Li W, Luo K, Naoumov NV, Hou J "Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China". J Viral Hepat 2005, 12:609-617.

Zoulim F. "Données actuelles sur le traitement de l'hépatite B chronique". Presse Med. 2008; 37: 287-293.

Zoulim F, Mimms L, Floreani M, Pichoud C, Chemin I, Kay A, I Vitvitski L, Trépo C
"New assays for quantitative determination of viral markers in management of chronic hepatitis B virus infection". Clin Microbiol 1992b, 30: 1111-1119.

Zoulim F, Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Strubin M, Hantz O, Protzer U
"Hepatitis B virus X protein is required for productive infection of human hepatocytes".
Journal of Hepatology 2010; 52: 43–54.

Zoulim F, Trepo C. *"Histoire naturelle de l'hépatite B chronique"*. Journal de Pharmacie Clinique. décembre 2005, Volume 24, Numéro 4, 233-7.

Zoulim F, Trépo C. *"Virus de l'hépatite B : répllication et mécanismes d'action des antiviraux"*. Virologie, Mai - Juin 1997, Volume 1, Numéro 3, 197-215.

SITES CONSULTÉS

PNLH SENEGAL Copyright © 2014 Epidémiologie au Sénégal sur <http://hepatites.sn/le-pnlh/les-hepatites-au-senegal.html> [consulté le 06/02/2014]

<http://hepatitesafrique.org/>



Annexes

Annexe 1 : Matériel et réactifs d'usage général au laboratoire de biologie moléculaire

1. Matériel

- Blouse blanche
- Gants sans talc
- Surchausses
- Hotte à flux laminaire
- Micropipettes de 1000, 200, 20, 10
- Embouts stériles à filtres p-1000, p-200, p-20, p-10
- Microtubes stériles de 1.5 et 2 ml
- Tubes falcon de 15 et 45 ml
- Centrifugeuse
- Incubateur
- Agitateur de type vortex
- Bouteille de jet d'eau de javel
- Bouteille de jet d'éthanol
- Bouteille de jet d'eau distillée
- Marqueurs indélébiles
- Chronomètres de laboratoire
- Papier essuie-tout
- Portoirs de tubes d'échantillon
- Réfrigérateurs
- Congélateurs
- Machine à glaçons
- Glacières de transport

1. 2. Réactifs

- Eau de Javel à 10 %
- Ethanol absolu
- Ethanol 70°
- Eau distillée
- Eau qualité biologie moléculaire (Eau RNase-Dnase free)

Annexe 2: Matériel et réactifs spécifiques au Cobas AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ HBV (CAP/CTM HBV)

1. Matériel

- Gants sans talc
- Micropipettes de 20-200µl et 100-1000µl
- Embouts stériles à filtre p200 et p1000
- Eau de Javel dilué au 1/10^{ème}
- Eau milliQ
- hotte à flux laminaire
- un marqueur indélébile
- un chronomètre
- SPU (unités de traitement des échantillons)
- K carrier
- Portoir K carrier
- K tips sur portoir
- K tubes sur portoir
- S tubes (tubes échantillon d'entrée)
- Portoir à échantillons (portoir SK 24)
- Portoirs à réactifs (pour les cassettes)
- Pincettes à code-barres (contrôles et échantillons)

2. Réactifs

- HBV2 CS1 : Cassette de réactifs de particules de verre magnétiques HBV
- HBV2 CS2 : Cassette de réactifs de lyse HBV
- HBV2 CS3 Cassette de multi-réactifs HBV : Solution de Protéinase, Tampon d'élution
- HBV2 CS4 Cassette de réactifs spécifiques au test HBV: Standard de Quantification du HBV, Master Mix HBV, Solution de Manganese HBV
- HBV H + : Contrôle fortement positif
- HBV L + : Contrôle faiblement positif
- CTM (-) : Contrôle négatif COBAS® TaqMan® (Plasma humain)
- COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent

Annexe 3: Matériel et réactifs spécifiques à la technique de PCR en temps réel

AMPLIX® HBV

1. 1. Matériel

- Gants sans talc
- 96 tubes de test (12 bandes × 8 tubes).
- Embouts stériles à filtre p100
- Micropipettes de 10-100µl
- Supports de microtubes de 0,2 ml

2. 2. Réactifs

- Solution de récupération des échantillons témoins (RSC) - 2 flacons de 4 ml chacun;
- Échantillon de contrôle positif faible lyophilisé - 1 flacon;
- Échantillon de contrôle positif lyophilisé - 2 flacons;
- Echantillons pour étalonnage, lyophilisés (CS1 et CS2)

Annexe 4 :Système COBAS® AmpliPrep / COBAS® TaqMan® 48



Annexe 5 : Système AMPLIX-16/ AmpliX NG Thermocycler



Introduction

La quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B (VHB) constitue un des éléments clés de la prise en charge de l'hépatite chronique B. Cette quantification permet une mesure plus directe et fiable de la réplication virale, la prise de décision de la mise sous du traitement antiviral et le suivi de la réponse virologique à la thérapeutique. De nouvelles plateformes de PCR en temps réel réalisant cette quantification et adaptables aux laboratoires intermédiaires ont été développées parmi lesquelles *AMPLIX® HBV* (Biosynex, France). C'est ainsi que cette étude a été menée pour évaluer les performances sur site de la technique de PCR en temps réel *AmpliX® (HBV)* en comparaison avec la technique *Cobas AmpliPrep™/Cobas TaqMan™ HBV*.

Méthode

Les performances de la technique de PCR en temps réel *AMPLIX® HBV* ont été évaluées selon les recommandations du Comité Français d'accréditation (COFRAC) pour la validation des méthodes d'analyse quantitatives. La répétabilité, la fidélité intermédiaire (reproductibilité), la justesse, l'incertitude et la contamination inter-échantillons ont été déterminés. La comparaison avec la technique de référence *Cobas Taqman™* a été réalisée en testant en parallèle 42 échantillons de plasma. L'analyse statistique a porté sur la détermination de la corrélation et la concordance grâce au logiciel *MethVal®* en considérant le *Cobas Taqman™* comme méthode de référence.

Résultats

Le test de PCR *Amplix®* a montré une bonne reproductibilité pour les 2 niveaux de contrôles faible (CV = **6,65%**) et élevé (CV = **3,15%**) mais également une bonne répétabilité pour les 2 niveaux de concentration faible (CV=**2,12%**,) et élevée (CV=**1,60%**) analysées. Une bonne justesse du test *Amplix®* a été obtenue avec une moyenne du biais inférieur à 5%. Les mesures de charge virale entre *Amplix®* et *Cobas Taqman™* corrélaient fortement avec un coefficient de corrélation de **0,927**. L'analyse de la concordance a donné une moyenne des différences de **0,43** entre les mesures de charge virale des 2 techniques.

Conclusion

De par ces résultats, la plateforme de PCR en temps réel *Amplix®* pour la quantification de l'ADN du VHB peut être considérée comme un système fiable pour la surveillance des patients atteints d'hépatite chronique B et aussi un système adapté aux laboratoires intermédiaires.

Mots clés : Hépatite B, charge virale, PCR en temps réel, *Amplix® HBV*, *Cobas AmpliPrep™/Cobas Taqman™*