

# Liste des abréviations et acronymes

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNccc</b>	covalently closed circular DNA
<b>Ag</b>	Antigène
<b>ALAT</b>	Alanine aminotransférase
<b>Anti-HBc</b>	Anticorps dirigé contre la protéine core du virus de l'hépatite B
<b>Anti-HBe</b>	Anticorps dirigé contre la protéine E du virus de l'hépatite B
<b>Anti-HBs</b>	Anticorps dirigé contre la protéine de surface du virus de l'hépatite B
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ASAT</b>	Aspartate aminotransférase
<b>CDC</b>	Centers for disease Control and Prevention
<b>CHC</b>	carcinome hépatocellulaire
<b>CNTS</b>	Centre National de Transfusion Sanguine
<b>COFRAC</b>	Comité Français d'accréditation
<b>dATP</b>	désoxy adénine tri-phosphate
<b>dCTP</b>	désoxy cytosine tri-phosphate
<b>dGTP</b>	désoxy guanine tri-phosphate
<b>DR</b>	Direct repeated sequence
<b>dTTP</b>	désoxy thymine tri-phosphate
<b>dUTP</b>	désoxy uridine tri-phosphate
<b>EASL</b>	European Association for the Study of the Liver
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>GRE</b>	Glucocorticoïd-responsive element
<b>HBlg</b>	immunoglobulines anti-hépatite B
<b>HBx</b>	Protéine X du virus de l'hépatite B
<b>IAPAC</b>	International Association of Providers of AIDS Care
<b>IFN</b>	Interféron
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IgG</b>	Immunoglobuline de type G
<b>IgM</b>	Immunoglobuline de type M
<b>INSERM</b>	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
<b>ISO</b>	Organisation internationale de normalisation
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>ONU</b>	Organisation des Nations Unies
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>PAL</b>	Phosphatase alcaline
<b>PBC</b>	Promoteur basal du core
<b>PCR</b>	Polymérase Chain Reaction

<b>PEG-IFN</b>	Interféron pégylé
<b>PEV</b>	Programme Elargi de Vaccination
<b>pgRNA</b>	ARN pré-génomique
<b>PNLH</b>	Programme National de Lutte contre les Hépatites
<b>TP</b>	Taux de prothrombine
<b>UNG</b>	uracile N glycosylase
<b>VHA</b>	virus de l'hépatite A
<b>VHB</b>	Virus de l'Hépatite B
<b>VHC</b>	virus de l'hépatite C
<b>VHD</b>	Virus de l'hépatite D
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>YMDD</b>	tyrosine-méthionine-aspartate-aspartate
<b>γGT</b>	gamma glutamyl-transpeptidase

# Liste des acides aminés

Nom complet de l'acide aminé	Code	Abréviation
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate ou acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate ou acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

# Liste des annexes

<b>Annexe 1:</b> Score METAVIR.....	120
<b>Annexe 2:</b> Matériel et réactifs d'usage général au laboratoire de biologie moléculaire.....	121
<b>Annexe 3:</b> Matériel et réactifs spécifiques au m2000.....	122
<b>Annexe 4:</b> Mode opératoire de la technique m2000.....	124
<b>Annexe 5:</b> Matériel et réactifs spécifiques à la technique maison de PCR.....	126
<b>Annexe 6:</b> Représentation du plasmide utilisé dans la gamme standard de la PCR maison.	127
<b>Annexe 7:</b> Protocole d'extraction de l'ADN du VHB.....	128
<b>Annexe 8:</b> Comparaison charge virale m2000 vs Sybr Green.....	130

# Table des illustrations

<b>Figure 1:</b> Les différentes formes virales du VHB. ....	6
<b>Figure 2:</b> Structure de la particule de Dane .....	6
<b>Figure 3:</b> Organisation du génome du virus de l'hépatite B .....	9
<b>Figure 4:</b> Cycle de réplication du VHB .....	14
<b>Figure 5:</b> Répartition géographique des géotypes et sous-types du VHB .....	17
<b>Figure 6:</b> Répartition mondiale de la prévalence du portage de l'Ag HBs.....	19
<b>Figure 7:</b> Histoire naturelle de l'infection par le VHB. ....	24
<b>Figure 8:</b> Evolution des marqueurs sérologiques au cours de l'histoire naturelle de l'infection chronique à VHB.....	29
<b>Figure 9 :</b> La distribution géographique parallèle de l'incidence du CHC (a) et celle de l'infection chronique au VHB (b). ....	32
<b>Figure 10:</b> Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite B aiguë résolutive. ....	35
<b>Figure 11:</b> Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite chronique. ....	36
<b>Figure 12:</b> Cinétique de la réaction de PCR en temps réel .....	42
<b>Figure 13:</b> a) Incidence cumulée de cirrhose en fonction de la charge virale .....	47
<b>Figure 14:</b> Incidence cumulée de la résistance aux médicaments antiviraux au cours d'essais-pivots chez des patients atteints d'hépatite B chronique, naïfs aux analogues nucléos(t)idiques .....	52
<b>Figure 15:</b> Les mutants de résistance médicamenteuse touchant la polymérase virale .....	54
<b>Figure 16:</b> Plateforme m2000sp (a) et m2000rt (b) et leurs centres de contrôle. ....	66
<b>Figure 17:</b> Principe d'action des sondes de type Taqman .....	68
<b>Figure 18:</b> a) Plateforme COBAS® AmpliPrep, b) COBAS Taqman 48 .....	69
<b>Figure 19:</b> Système Applied Biosyste ABI 7300.....	72
<b>Figure 20:</b> Principe de l'extraction d'ADN par le kit Qiagen .....	73
<b>Figure 21:</b> Région ciblée du génome viral (par la technique maison) .....	73
<b>Figure 22:</b> Principe d'action du SYBR Green I.....	75

<b>Figure 23:</b> Graphique de la dérivée de la fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification.....	75
<b>Figure 24:</b> Courbe de la fluorescence en fonction de la température. ....	77
<b>Figure 25:</b> Courbe de dissociation.....	77
<b>Figure 26:</b> Principe de la courbe de dissociation .....	78
<b>Figure 27:</b> Programme de températures sur ABI 7300.....	81
<b>Figure 28:</b> Droite de régression Taqman VS m2000 .....	88
<b>Figure 29:</b> Bland-Altman Taqman VS m2000 .....	89
<b>Figure 30:</b> Exemple de droite standard (série du 06/06/2013) .....	90
<b>Figure 31:</b> Exemple de courbe de fusion (série du 06/06/2013) .....	91
<b>Figure 32:</b> Diagramme de Levey-Jennings du contrôle positif à concentration moyenne .....	94
<b>Figure 33:</b> Diagramme de Levey-Jennings du contrôle positif à forte concentration .....	94
<b>Figure 34:</b> Droite de régression m2000 VS SYBR Green.....	98
<b>Figure 35:</b> Bland-Altman SYBR Green VS m2000 .....	98
<b>Figure 36:</b> Organisation du plan de travail.....	125
<b>Figure 37 :</b> Plasmide utilisé pour la gamme standard de la technique maison .....	127

# Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Interprétation des résultats de sérologie de l'infection à VHB .....	39
<b>Tableau II:</b> Conversion des copies d'ADN VHB/ml en UI/ml.....	45
<b>Tableau III:</b> Directives de l'EASL pour le traitement de l'hépatite B chronique .....	50
<b>Tableau IV:</b> Amorces sens et anti-sens utilisées pour la PCR maison.....	79
<b>Tableau V:</b> Plan de la plaque PCR .....	80
<b>Tableau VI:</b> Plan de la plaque PCR pour l'évaluation de la contamination inter-échantillons	85
<b>Tableau VII:</b> Résultats de charge virale m2000/Taqman.....	87
<b>Tableau VIII:</b> Résultats de la répétabilité de la technique maison .....	92
<b>Tableau IX:</b> Résultats de l'analyse de reproductibilité intra-laboratoire de la technique maison .....	93
<b>Tableau X:</b> Répartition des résultats de m2000 selon les valeurs de charge virale .....	97
<b>Tableau XI:</b> Répartition des différences de charge virale entre m2000 et la technique SYBR Green .....	99
<b>Tableau XII:</b> Répartition des différences de charge virale en fonction des niveaux de charge virale .....	100
<b>Tableau XIII:</b> Comparaison du coût et de la durée moyenne de l'examen pour les 3 techniques de charge virale (m2000, Taqman, SYBR Green).....	100

# SOMMAIRE

Introduction.....	1
<b>PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE VIRUS DE L'HEPATITE B.....	4
1 Origine du virus de l'hépatite B.....	4
2 Virus de l'hépatite B.....	6
2.1 Classification.....	6
2.2 Structure du virus.....	6
2.2.1 Génome viral.....	7
2.2.2 Protéines virales.....	10
2.3 Cycle de réplication viral.....	12
2.3.1 Fixation et entrée virale.....	12
2.3.2 Libération du génome viral.....	12
2.3.3 Formation de l'ADN superenroulé.....	12
2.3.4 Transcription virale.....	13
2.3.5 Encapsidation.....	13
2.3.6 Transcription inverse et synthèse du brin plus d'ADN.....	13
2.3.7 Devenir des capsides virales.....	13
2.4 Variabilité génétique du VHB.....	15
2.4.1 Sérotypes.....	15
2.4.2 Génotypes.....	15
2.4.3 Recombinaisons.....	17
2.4.4 Mutations du VHB.....	17
3 Epidémiologie de l'hépatite B.....	18
3.1 Répartition géographique de l'hépatite B.....	18
3.2 Modes de transmission du VHB.....	20
4 Histoire naturelle de l'infection par le VHB.....	23
4.1 Infection aiguë par le VHB.....	24
4.1.1 Forme classique.....	24
4.1.2 Forme fulminante.....	25
4.1.3 Passage à la chronicité.....	25



4.2	Infection chronique par le VHB .....	26
4.3	Complications .....	30
4.3.1	Cirrhose .....	30
4.3.2	Décompensation hépatique .....	30
4.3.3	Carcinome hépatocellulaire .....	31
4.3.4	Hépatite D et complication de l'hépatite B.....	33
5	Cinétique des marqueurs sérologiques.....	33
5.1	Au cours d'hépatites aiguës.....	33
5.2	Au cours d'hépatites chroniques.....	35
6	Diagnostic et suivi biologiques de l'infection chronique à VHB.....	36
6.1	Diagnostic virologique de l'infection à VHB .....	37
6.1.1	Recherche des antigènes viraux.....	37
6.1.2	Recherche des anticorps spécifiques. ....	38
6.1.3	Interprétation des marqueurs sérologiques pour l'infection à VHB.....	38
6.2	Diagnostic moléculaire de l'infection à VHB. ....	39
6.2.1	Techniques d'amplification du signal .....	40
6.2.2	Techniques d'amplification de la cible .....	40
6.2.3	PCR en temps réel .....	41
6.2.4	Expression des résultats de charge virale .....	45
6.3	Suivi de l'infection chronique .....	45
6.3.1	Bilan de base .....	45
6.3.2	Suivi des patients non traités .....	46
6.3.3	Charge virale et suivi de l'évolution de l'hépatite B chronique. ....	46
7	Traitement de l'hépatite B chronique.....	49
7.1	Le but du traitement.....	49
7.2	Les indications pour le traitement.....	49
7.3	Les stratégies thérapeutiques .....	50
7.4	Les mutants d'échappement au traitement.....	53
7.5	Intérêt de la mesure de la charge virale au cours du traitement anti-VHB .....	54
8	Prévention de l'hépatite B.....	56

CHAPITRE II : VALIDATION DE METHODE SELON LES NORMES DU COFRAC .....	58
1 Spécificité analytique .....	58
2 Fidélité.....	58
2.1 Répétabilité.....	58
2.2 Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire).....	59
3 Justesse.....	59
4 Incertitude .....	60
5 Contamination.....	60
6 Intervalle de mesure .....	60
6.1 Limite de détection.....	60
6.2 Limite de quantification.....	61
7 Stabilité des réactifs .....	61
8 Robustesse .....	61
9 Comparaison avec une technique de référence .....	62

## **DEUXIEME PARTIE: TRAVAIL EXPERIMENTAL**

### CHAPITRE I: JUSTIFICATIF, OBJECTIFS ET CADRE DE L'ETUDE, ET L'ECHANTILLONNAGE

1 Justificatif de l'étude .....	63
2 Objectifs de l'étude .....	63
2.1 Objectif général .....	63
2.2 Objectifs spécifiques.....	64
3 Cadre de l'étude .....	64
3.1 Les sites de prélèvement des échantillons.....	64
3.2 Le site de traitement des échantillons .....	64
4 Echantillonnage .....	65

### CHAPITRE II: METHODOLOGIE

1 Vérification des performances du m2000 par comparaison avec la technique Taqman	65
1.1 Technique m2000 Abbott Real Time .....	65
1.1.1 Matériel et réactifs spécifiques au m2000.....	66
1.1.2 Principes biologiques de la technique.....	66
1.1.3 Mode opératoire .....	68
1.1.4 Critères de validité des résultats sur m2000rt .....	68

1.1.5	Performances de la technique .....	68
1.2	Technique COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, v2.0 (Roche).....	69
1.2.1	Principes biologiques de la procédure .....	69
1.2.2	Performances de la technique .....	71
2	Evaluation des performances de la technique « maison » de charge virale .....	71
2.1	Présentation générale de la technique « maison ».....	71
2.1.1	Équipement .....	71
2.1.2	Matériel et réactifs de la technique « maison » .....	72
2.1.3	Principes biologiques et analytiques de la procédure .....	72
2.1.4	Mode opératoire .....	78
2.1.5	Lecture et analyse des données de la PCR.....	81
2.2	Evaluation des critères de performance de la technique « maison ».....	83
2.2.1	Fidélité.....	83
2.2.2	Justesse.....	83
2.2.3	Incertitude .....	83
2.2.4	Contamination entre les échantillons .....	83
2.2.5	Comparaison de la technique maison du SYBR Green avec une technique de référence .....	83
3	Analyse statistique .....	86

### CHAPITRE III: RESULTATS

1	Analyse des performances du m2000.....	87
2	Evaluation des performances de la technique « maison » .....	89
2.1	Analyse des données de la PCR maison .....	89
2.1.1	La droite standard .....	89
2.1.2	Les contrôles.....	90
2.1.3	La courbe de fusion .....	91
2.2	Etude des critères de performance de la PCR « maison » .....	91
2.2.1	Evaluation de la fidélité.....	91
2.2.2	Calcul de la justesse.....	95
2.2.3	Calcul de l'incertitude.....	96
2.2.4	Contamination.....	96
2.3	Comparaison des méthodes SYBR Green VS m2000.....	97

2.4	Comparaison du coût et de la durée de l'examen .....	100
CHAPITRE IV: DISCUSSION		
	CONCLUSION .....	106
	PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS.....	108
	SITES CONSULTES .....	109
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	110
	ANNEXES .....	120

## Introduction

L'hépatite B est une infection du foie largement répandue dans le monde et est causée par le Virus de l'Hépatite B (VHB), un petit virus à ADN, appartenant à la famille des Hepadnaviridae.

Cette pathologie constitue un réel problème de santé publique avec 2 milliards de personnes infectées par le virus dans le monde. Parmi eux, plus de 370 millions sont des porteurs chroniques (Institut Pasteur, 2013) et près de 600 000 personnes meurent chaque année des conséquences aiguës ou chroniques de l'hépatite B **(OMS, 2012)**.

En Afrique, 65 millions de personnes sont des porteurs chroniques du VHB et la plus forte endémicité est retrouvée en Afrique Subsaharienne avec une prévalence de l'antigène HBs (Ag HBs) supérieure à 8%. **(A. Kramvis et coll., 2007)**.

Au Sénégal, l'infection par le VHB est fortement endémique, avec 11% de porteurs chroniques dans la population générale (<http://www.hepatitesafrique.org>).

La gravité de l'hépatite B chronique est constituée par un risque élevé d'évolution vers une fibrose hépatique suivie d'une cirrhose puis d'un cancer du foie en absence de traitement. En effet le VHB est responsable de 30% des cas de cirrhose et de 53% des cas de carcinome hépatocellulaire (CHC) **(L. Benvegnu et coll., 1994, J. F. Perz et coll., 2006)**.

Les niveaux élevés d'ADN viral sont de bons prédicteurs de ces complications. Ainsi, des études ont montré que la progression vers la cirrhose et le CHC, chez les patients atteints d'hépatite B chronique, est fortement corrélée avec des taux élevés de charge virale **(C. J. Chen et coll., 2006, U. H. Iloeje et coll., 2006, B. Tang et coll., 2004)**.

D'où l'intérêt d'un bon suivi du patient et d'une mesure régulière de la charge virale.

La mesure de la charge virale VHB présente également un intérêt primordial dans la prise de décision pour la mise en place d'un traitement, à côté du taux de transaminases et de l'examen clinique. De plus, la charge virale VHB représente un marqueur prédictif de la réponse au traitement, et un bon marqueur de suivi des patients traités. En effet, malgré l'efficacité des molécules antivirales utilisées, des risques de résistance aux médicaments peuvent apparaître à long terme, conduisant à l'échappement thérapeutique et à la reprise de l'évolution de l'atteinte hépatique chronique. Ceci peut être détectable par la mesure de

la charge virale (EASL, 2012, R. P. Perrillo et coll., 1990, A. A. van der Eijk et coll., 2006, M. F. Yuen et coll., 2001)

D'autre part la charge virale du VHB est indispensable dans le cas où la sérologie n'est pas suffisamment informative. C'est le cas de mutants pré-C/C (mutations au niveau de la région pré-core/core du génome viral) qui sont à l'origine de l'arrêt de la synthèse de l'antigène HBe (Ag HBe), ou à une diminution de son expression et sont responsables de la majorité des cas d'hépatite chronique liée à un variant négatif pour l'Ag HBe alors que la réplication virale pourrait être active (C. J. Liu et coll., 2006). C'est également le cas de mutants d'échappement à la vaccination ou mutants « s » qui pourraient provoquer la non-reconnaissance de l'Ag HBs muté par les anticorps des réactifs de dépistage de l'Ag HBs (S. Louisirotnchanakul et coll., 2004)

Il est donc important d'avoir des tests précis, sensibles et fiables de quantification de l'ADN viral, pour une surveillance optimale des patients infectés.

Les méthodes de quantification de l'ADN viral les plus répandues aujourd'hui sont basées sur les méthodes d'ADN branché (bDNA) et les techniques de PCR (Polymérase Chain Reaction) en temps réel. Ces dernières reposent sur une analyse de la cinétique de la réaction PCR au moyen d'un système capable de détecter et de quantifier les amplicons formés après chaque cycle d'amplification. Ces systèmes font appel soit à un agent intercalant qui s'incorpore dans l'ADN double brin, soit à une sonde fluorogénique allant s'hybrider de manière spécifique sur le fragment cible à amplifier. Quelle que soit la technologie utilisée, l'appareil mesure l'émission de fluorescence, qui est proportionnelle à la quantité d'amplicons d'ADN générés au cours de la réaction de PCR.

Au Sénégal, les plateaux techniques pour la mesure de la charge virale VHB ne sont pas toujours disponibles : ces examens sont généralement sous-traités à l'étranger et leur coût élevé limite leur accès à une bonne partie de la population malade. Ainsi, la non disponibilité de ces techniques semble être un obstacle majeur à la prise en charge des patients infectés par le VHB, vivant dans les pays à ressources limitées. D'où la nécessité de mettre au point et de valider une technique maison pour la quantification de l'ADN viral afin de remédier à cet obstacle.

Le but de notre étude a été de mettre en place une technique maison de PCR en temps réel pour la mesure de la charge virale VHB, et d'évaluer ses performances. Cette technique est

basée sur l'amplification et la détection en temps réel, d'une partie du gène codant pour la polymérase virale, par l'utilisation d'un agent intercalent, le SYBR Green I.

Pour atteindre notre objectif, nous avons évalué les performances de la technique maison pour la mesure de charge virale de patients infectés par le VHB en vérifiant plusieurs paramètres analytiques. De ce fait, nous avons comparé les résultats de charge virale obtenus par la technique maison, avec ceux fournis par une technique commerciale Abbott m2000 Real-time, disponible dans l'unité de Biologie Moléculaire du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec (LBV-HALD), par étude de la corrélation et la concordance entre ces deux techniques. Ce travail s'articulera alors en deux parties :

- La première partie sera consacrée à la revue bibliographique sur l'infection par le VHB
- La deuxième partie concernera notre travail expérimental où seront présentés le matériel, la méthodologie utilisée, puis les résultats obtenus qui seront alors discutés pour en tirer une conclusion et proposer des recommandations et des perspectives.

Rapport-Gratuit.com

**PREMIERE PARTIE :**  
**Revue**  
**bibliographique**



# CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE VIRUS DE L'HEPATITE B

## 1 Origine du virus de l'hépatite B

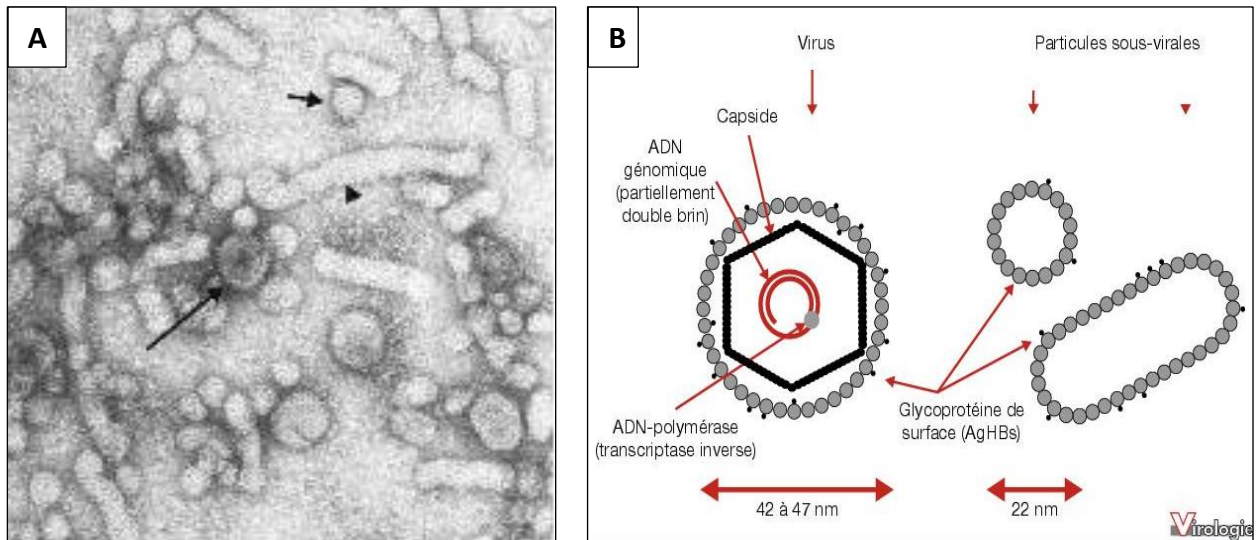
La première épidémie enregistrée comme provoquée par le virus de l'hépatite B a été observée par Lurman en 1885. Durant cette période, à Brême (Allemagne), Lurman pratiquait des vaccinations contre la variole, utilisant un vaccin à base de lymphes humaines glycinées. Après avoir vacciné 1289 ouvriers 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.

Dans les années 1940, F.O. McCallum, au cours de ses travaux sur un vaccin contre la fièvre jaune (contenant du sérum humain), observa qu'une proportion non négligeable des soldats recevant ce vaccin, développait une hépatite quelques mois plus tard. McCallum rapprocha cette situation aux cas plus anciens d'hépatites observés suite à l'inoculation de vaccins à base de sérum humain, ainsi qu'à ceux survenant après utilisation de seringues non stériles, reportés par la littérature médicale.

F.O. McCallum proposa alors en 1947 le terme d'hépatite A pour l'hépatite contagieuse ou épidémique transmise essentiellement par voie oro-fécale, et d'hépatite B pour l'hépatite sérique transmise après exposition à du sang contaminé (**J. L. Payen et coll., 2002**). En 1961, il démontra que des anticorps développés chez des personnes polytransfusées précipitaient avec des lipoprotéines de faible densité. Suite à ses expériences, il mit en évidence une réaction inhabituelle entre le sérum des 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 » (connu plus tard sous le nom d'antigène de surface de l'hépatite B, ou AgHBs). L'antigène « Au » a été surtout observé chez les patients atteints de leucémie, et l'anticorps dirigé contre cet antigène a été surtout rencontré chez les polytransfusés hémophiles (**H. J. Alter et coll., 1966**).

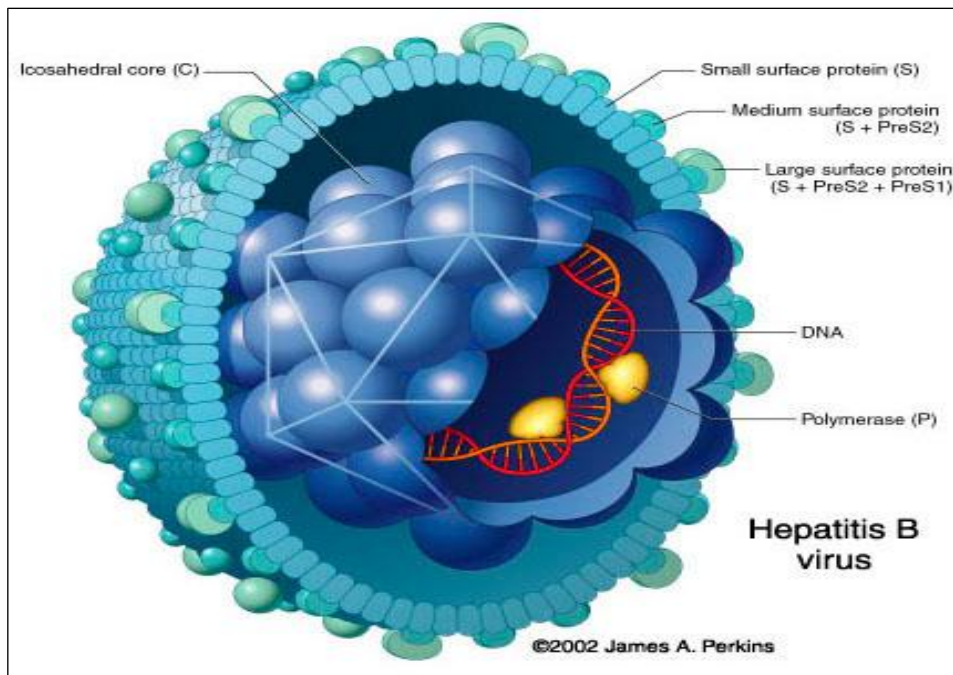
En 1965, des hypothèses sur la nature infectieuse de l'antigène « Au » ont été émises, et en 1967 Blumberg et son équipe établirent un lien entre cet antigène et l'hépatite B (**B. S. Blumberg et coll., 1968**).

Un pas décisif était alors franchi ; c'est alors qu'en 1970, Dane identifia en microscopie électronique, dans le sérum de patients positifs pour l'antigène « Au », des particules de 42 nm de diamètre (particules de Dane) ressemblant à des particules virales (**D. S. Dane et coll., 1970**).



**Figure 1: Les différentes formes virales du VHB.**

**A.** Micrographie obtenue en microscopie électronique à transmission d'un sérum de patient infecté par le HBV. Trois types différents de particules sont mises en évidence : (i) des particules virales infectieuses appelées particules de Dane (grande flèche), (ii) des particules sous-virales (PSV) non infectieuses de forme sphérique (flèche moyenne) et (iii) des PSV non infectieuses de forme allongées en bâtonnet (tête de flèche). **B.** Représentations schématiques de la structure des particules du HBV. (R Patient, 2008)



**Figure 2: Structure de la particule de Dane (A. Goffard, 2010)**

## 2 Virus de l'hépatite B

### 2.1 Classification

Le VHB appartient au groupe des Pararétrovirus à ADN double brin (Groupe taxonomique VII du règne des Virus selon la classification de Baltimore) ; ces pararétrovirus ont recours à une activité de rétro-transcription au cours de leur réplication. Le VHB appartient à la famille des Hepadnaviridae et au genre Orthohepadnavirus. Il est considéré comme le prototype de la famille des hépadnavirus telle que définie par le comité international de taxonomie des virus. **(I. D. Gust et coll., 1986)**

### 2.2 Structure du virus

L'examen en microscopie électronique du sérum d'un sujet infecté par le VHB révèle trois types de particules (Figure 1) : la particule de Dane (particule virale) et les particules sous-virales (formes sphériques et filamenteuses).

Les formes sphériques (17 à 25 nm de diamètre) et les formes filamenteuses (17 à 25 nm de diamètre et plusieurs centaines de nanomètres de long) sont les plus nombreuses (jusqu'à  $10^{13}$ /ml de sérum) et ne sont pas infectieuses ; elles correspondent à une synthèse en excès des protéines d'enveloppe du VHB, et pourraient servir à absorber des anticorps neutralisants contre les antigènes de surface, permettant ainsi au virus d'échapper à l'hôte.

La particule de Dane ou virion (Figure 2), de 42 nanomètres de diamètre, est la particule infectieuse dont la concentration dans le sérum varie et peut atteindre  $10^9$  particules/ml. Le virion comprend :

- Une enveloppe lipoprotéique constituée majoritairement par trois glycoprotéines virales : la protéine S (small, également connue sous le nom d'Ag HBs) et les protéines M (middle) et L (large).
- Une nucléocapside de structure icosaédrique de 25-27 nm de diamètre, comportant les antigènes de capsid Hbc (ou protéine C) : elle contient l'ADN viral et l'ADN polymérase virale **(F. Dubois, 1998, F. Zoulim, 2004)**

## 2.2.1 Génome viral

### 2.2.1.1 Structure ADN viral

Le génome du VHB est le plus petit génome connu parmi les virus à ADN. **(W. S. Robinson et coll., 1974)**

Le VHB est un virus à ADN circulaire, partiellement bicaténaire, d'environ 3 200 nucléotides. Son ADN a été séquencé dès 1979 et la numérotation des bases du génome est faite à partir du site unique de restriction par l'enzyme *Eco* RI. **(P. Charnay et coll., 1979b, F. Galibert et coll., 1979, J. Summers et coll., 1975)**

L'ADN du virion est formé par un brin de polarité négative (brin (-)), codant, de longueur constante et d'un brin court de polarité positive (brin (+)) de longueur variable (50 à 100 % de la taille du génome) **(F. Zoulim et coll., 1997)**. L'ADN peut être rendu totalement bicaténaire sous l'action de l'ADN polymérase virale endogène contenue dans la nucléocapside virale. **(J. Summers, et coll., 1975)**

Le maintien de la forme circulaire de l'ADN est assuré par l'appariement des extrémités 5' des deux brins dans une région d'une longueur de 200 nucléotides appelée région cohésive **(P. Charnay, et coll., 1979b, F. Zoulim, et coll., 1997)**. Les deux brins sont modifiés à leur extrémité 5': le brin (-) est lié de façon covalente au domaine N-terminal de la polymérase virale, le brin (+) est amorcé par une courte séquence d'ARN provenant de l'ARN pré génomique **(F. Dubois, 1998)**.

### 2.2.1.2 Organisation génomique

Le VHB présente une organisation génétique compacte. Sur le brin négatif, quatre cadres de lectures ouverts (ORF : Open Reading Frame) ont été identifiées : S, C, P, X. **(F. Galibert, et coll., 1979, P. Tiollais et coll., 1981)**. Un cadre de lecture ouvert est une séquence nucléotidique codante, permettant la transcription et la traduction du génome (Figure 3). Ces quatre régions codantes se chevauchent, permettant ainsi au petit génome du VHB d'augmenter sa région codante. Ces ORF codent pour les protéines virales.

- ORF *prés/S*

Le gène *prés/S*, code les protéines d'enveloppe **(P. Charnay et coll., 1979a)**. Il contient trois codons d'initiation en phase qui divisent cet ORF en trois régions : pré-S1, pré-S2 et S. La

région préS1/préS2/S code pour la grande protéine L, la région préS2/S pour la protéine moyenne M et la région S pour la petite protéine (ou antigène HBs, Ag HBs). Ces protéines ont toutes la même spécificité antigénique HBs (**M. Servant-Delmas et coll., 2007**). Dans le génome viral, Pre-S1 est à la position nucléotidique 2848-3212, et la partie Pré-S2/S est à la position 1-835. ([Http://HbvdB.lbcP.fr/Tmp/DsqyhkrG4gcncIvo/Ab106564\\_Entry.Txt](http://HbvdB.lbcP.fr/Tmp/DsqyhkrG4gcncIvo/Ab106564_Entry.Txt))

- ORF préC/C

L'induction de la transcription à partir de la région C (position 1901-2452 du génome viral) donne lieu à la synthèse de la protéine de capsid : l'antigène HBc (Ag HBc), qui est la protéine structurale majeure de la capsid. Elle possède une extrémité C-terminale basique. La lecture en phase des gènes pré-C + C (position 1814-2452) conduit à la sécrétion d'une protéine non structurale qui diffère de la protéine de capsid par la présence d'une séquence supplémentaire de 29 acides aminés, en position N-terminale. Les 19 premiers acides aminés de cette séquence forment un peptide signal, qui dirige la protéine vers le réticulum endoplasmique. Cette protéine transite par l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire et, pendant le transport, le peptide signal et la queue basique sont éliminés. La protéine maturée, l'antigène HBe (Ag HBe), de 16 kDa (kilodalton) est sécrétée sous forme soluble dans le sérum des patients infectés. (**D. N. Standing et coll., 1988**)

- ORF P

La région P (position nucléotidique 2307 à 3212 et de 1 à 1623) recouvre 80 % du génome et code pour une protéine d'environ 90 kDa, l'ADN polymérase virale (**P. Tiollais, et coll., 1981**)

- ORF X

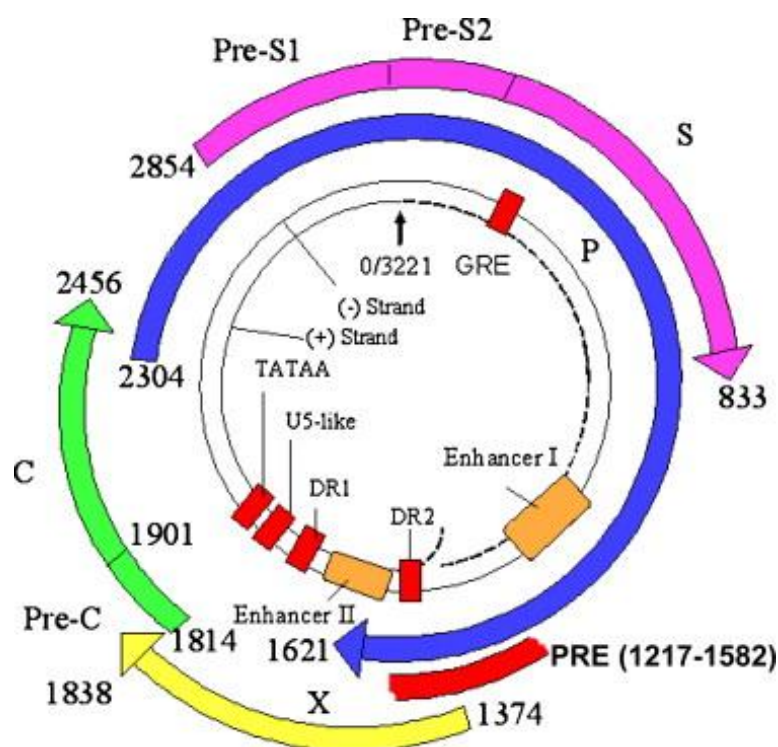
Le gène X (position nucléotidique 1374 à 1838) code pour la protéine X dont le rôle n'est pas totalement élucidé.

Il existe d'autres éléments fonctionnels importants dans le génome du VHB. Il s'agit des séquences directement répétées (DR1 et DR2), d'environ onze nucléotides qui sont situées de part et d'autre de la région cohésive. DR1 est localisée à l'extrémité 5' du brin (-) (ainsi que dans la séquence redondante en 3') et DR2 à l'extrémité 5' du brin (+). Ces séquences jouent un rôle majeur dans l'initiation de la synthèse de chacun des brins de l'ADN viral.

Un signal de polyadénylation présent à l'extrémité 5' de la région C et joue un rôle majeur dans la transcription des ARNm viraux. Deux éléments activateurs de la transcription ont également été détectés dans le génome viral: l'un en amont du gène X (nommé *enhancer I*), l'autre (*enhancer II*) en amont du promoteur du gène pré-C (F. Zoulim, et coll., 1997).

Un autre élément (noté PRE: post-transcriptional regulatory element), localisé approximativement entre les nucléotides 1200 et 1650 a été rapporté en 1993. Il a été démontré que cet élément agissait au niveau post-transcriptionnel en améliorant l'expression des transcrits d'ARN. Cet élément exerce sa fonction en inhibant l'épissage et en facilitant le transport et l'utilisation des transcrits d'ARN du noyau au cytoplasme.(J. Huang et coll., 1993)

L'ADN du VHB contient également un élément sensible aux glucocorticoïdes noté GRE (Glucocorticoïd-responsive element), qui augmente l'expression des gènes (R. Tur-Kaspa et coll., 1986).



**Figure 3: Organisation du génome du virus de l'hépatite B**

L'ADN partiellement double brin du VHB est représenté par les lignes noires au centre. Le trait pointillé représente l'extrémité variable du brin (+). Les flèches en couleur représentent les 4 cadres ouverts de lecture (S, C, P, X) situés sur le brin négatif. Les différentes positions nucléotidiques sont également indiquées par les nombres sur la figure. (G. H. Lee et coll., 2008)

## **2.2.2 Protéines virales**

### **2.2.2.1 Protéines de surface (ou d'enveloppe)**

Trois types de protéines entrent dans la composition de l'enveloppe du VHB, dans des proportions différentes selon le type de particule :

- la protéine S de 266 acides aminés (24kDa) est majoritaire quel que soit le type de particule. C'est une protéine membranaire, et le modèle couramment admis est qu'elle possède quatre régions hydrophobes et transmembranaires avec une large région centrale et hydrophile exposée à la surface de la particule virale.
- la protéine M de 30 kDa, possède 55 acides aminés N-terminaux supplémentaires, elle représente 10 % des protéines d'enveloppe des différentes particules. Elle possède la même topologie membranaire que la protéine S. Elle ne semble pas être essentielle pour la morphogenèse des particules infectieuses.
- la protéine L de 39 kDa, ne représente que 10 à 25 % des protéines d'enveloppe des virions et des filaments contre seulement 1 % pour les formes sphériques. Elle a en outre l'étonnante propriété d'adopter deux topologies transmembranaires :
  - L'une, en exposant les domaines pré-S1/pré-S2 sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique, permettant le bourgeonnement du virus
  - L'autre, en exposant ces mêmes domaines sur la face interne du réticulum endoplasmique, est essentielle à la reconnaissance du récepteur du VHB à la surface des hépatocytes.

### **2.2.2.2 Protéine de capsid**

La protéine core (ou capsid) de 21,5 kDa est la protéine structurale majeure de la capsid. Elle est constituée dans sa région N-terminale, d'un domaine important pour l'auto-assemblage et, en C-terminale, d'un domaine riche en arginine responsable de l'encapsidation de l'ARN dans la particule. **(F. Dubois, 1998, D. Sitterlin et coll., 2000)**

### **2.2.2.3 La polymérase**

La polymérase virale (832 à 845 acides aminés selon le génotype du VHB; 92 kDa) possède 3 domaines fonctionnels impliqués dans la réplication et un domaine non essentiel. (G. Radziwill et coll., 1990) De 5' à 3' on a respectivement :



- l'extrémité N-terminale ou TP (Terminal Protein) permet la liaison covalente de la protéine avec l'extrémité 5' du brin (-) d'ADN et sert également d'amorce pour la réplication de l'ADN viral. **(R. Bartenschlager et coll., 1988)**
- le domaine SPACER n'est pas indispensable aux activités de la polymérase car tolère l'introduction de substitutions, délétions et insertions sans altérer la fonction de la polymérase virale **(G. Radziwill, et coll., 1990)**.
- la région ADN polymérase /transcriptase inverse : Elle a une activité ADN-polymérase ARN/ADN dépendante et sert à la synthèse d'une nouvelle molécule d'ADN à partir d'un intermédiaire ARN pré génomique. Elle a aussi une activité transcriptase inverse. Cette région contient un motif peptidique (YMDD : tyrosine-méthionine-aspartate-aspartate) important pour l'activité de transcription inverse.
- le domaine RNase H est responsable de la dégradation de l'ARN pré-génomique lors de la synthèse du brin (-) de l'ADN viral. Ce domaine contribue dans une certaine mesure à l'activité de l'ADN polymérase **(G. Radziwill, et coll., 1990)**.

#### ***2.2.2.4 La protéine X***

La protéine X (HBx) est une petite protéine de 154 aa et de 17 kDa qui a été découverte en 1985 grâce à l'identification d'anticorps dirigés contre des épitopes de cette protéine **(A. Kay et coll., 1985)**.

Cette protéine joue le rôle de transactivateur de par sa capacité à stimuler des promoteurs du VHB **(H. Nakatake et coll., 1993, D. F. Spandau et coll., 1988)**. La protéine HBx agit soit par interaction avec d'autres facteurs de transcription cellulaires ou via une voie de transduction du signal contrôlée par la protéine kinase C **(A. S. Kekule et coll., 1993)**. Il a également été établi que le gène HBx était responsable de cancer du foie chez les souris transgéniques **(C. M. Kim et coll., 1991)**. Ainsi, la protéine X joue un rôle crucial dans la pathogenèse du carcinome hépatocellulaire. **(G. Y. Hwang et coll., 2003, K. Koike et coll., 1994)**

## 2.3 Cycle de réplication viral

Le cycle de réplication du VHB se déroule en 7 étapes et est représenté dans la figure 4

### 2.3.1 Fixation et entrée virale

Classiquement, on caractérise le VHB par son hépatotropisme : l'hépatocyte constitue le site majoritaire de l'infection virale. Cette spécificité tissulaire semble être due à la présence d'un ou de plusieurs récepteurs et/ou co-récepteurs hépatocytaires qui demeurent peu connus. L'attachement du virion aux récepteurs cellulaires nécessite la région N-terminale du domaine pré-S1 de la grande protéine(L) de surface (plus précisément, les acides aminés 21-47) (U. Klingmuller et coll., 1993, M. A. Petit et coll., 1992, P. Pontisso et coll., 1991).

Après sa fixation sur ces récepteurs, le virus peut pénétrer dans l'hépatocyte soit après fusion de son enveloppe avec la membrane cellulaire, soit par endocytose, suivie par la libération des nucléocapsides à partir de vésicules d'endocytose.

### 2.3.2 Libération du génome viral

Après libération de la nucléocapside virale dans le cytoplasme, elle est transportée vers le noyau via le réseau des microtubules.

Du fait de sa petite taille, la nucléocapside peut franchir l'enveloppe nucléaire en passant par le pore nucléaire. Le génome viral est alors libéré dans le noyau de la cellule hôte (S. Urban et coll., 2010 ).

### 2.3.3 Formation de l'ADN superenroulé

L'ADN viral, encore partiellement double brin est réparé, pour donner naissance à de l'ADN bi caténaire circulaire refermé sous forme super enroulée, appelé ADNccc (*covalently closed circular DNA*). (S. Urban, et coll., 2010 )(S. Urban, et coll., 2010 )(S. Urban, et coll., 2010 )(S. Urban, et coll., 2010 ) Cette réparation implique une ADN polymérase cellulaire et ne dépend pas de l'activité de la polymérase virale. Cet ADN superenroulé s'accumule dans le noyau sous la forme de mini chromosomes (J. Köck et coll., 1993, S. Urban, et coll., 2010 ).

### **2.3.4 Transcription virale**

Le brin négatif de l'ADNccc sert de matrice pour la transcription, par l'ARN polymérase II cellulaire, des ARN messagers génomique et sous-génomique.

Les ARN sous-génomiques sont au nombre de trois et sont de 2.4 Kb, 2.1 Kb et 0.7 Kb et servent respectivement à la synthèse des protéines d'enveloppe pré-S1, pré-S2 et S et enfin de la protéine X. L'ARN génomique de 3.5 Kb est traduit en protéines du précocore, core et de la polymérase virale. Il est également appelé ARN pré-génomique (pgRNA) puisqu'il sert de matrice pour la synthèse du brin négatif de l'ADN viral par transcription inverse (**S. Datta et coll., 2012**).

### **2.3.5 Encapsidation**

Un signal d'encapsidation, appelé epsilon et qui a une structure secondaire en épingle à cheveux, est présent à l'extrémité 5' de l'ARN pré-génomique. Il permet une encapsidation spécifique de cet ARN, excluant les ARNm viraux et cellulaires. Cette encapsidation est déclenchée par une interaction entre la structure epsilon et l'ADN polymérase virale, suivie d'un assemblage multimérique de la protéine de capsid autour de ce complexe. L'encapsidation s'effectue dans le compartiment cytoplasmique. (**S. Datta, et coll., 2012**).

En plus de son rôle d'encapsidation, ce signal est également impliqué dans l'initiation de la synthèse de l'ADN par la transcriptase inverse (**G. H. Wang et coll., 1994**).

### **2.3.6 Transcription inverse et synthèse du brin plus d'ADN**

La polymérase virale, par son activité transcriptase inverse, permet la synthèse d'un brin d'ADN de polarité négative, à partir de l'ARN pré-génomique. Parallèlement au processus d'élongation du brin moins d'ADN, une activité RNase H de la polymérase virale dégrade l'ARN pré-génomique qui a servi de matrice.

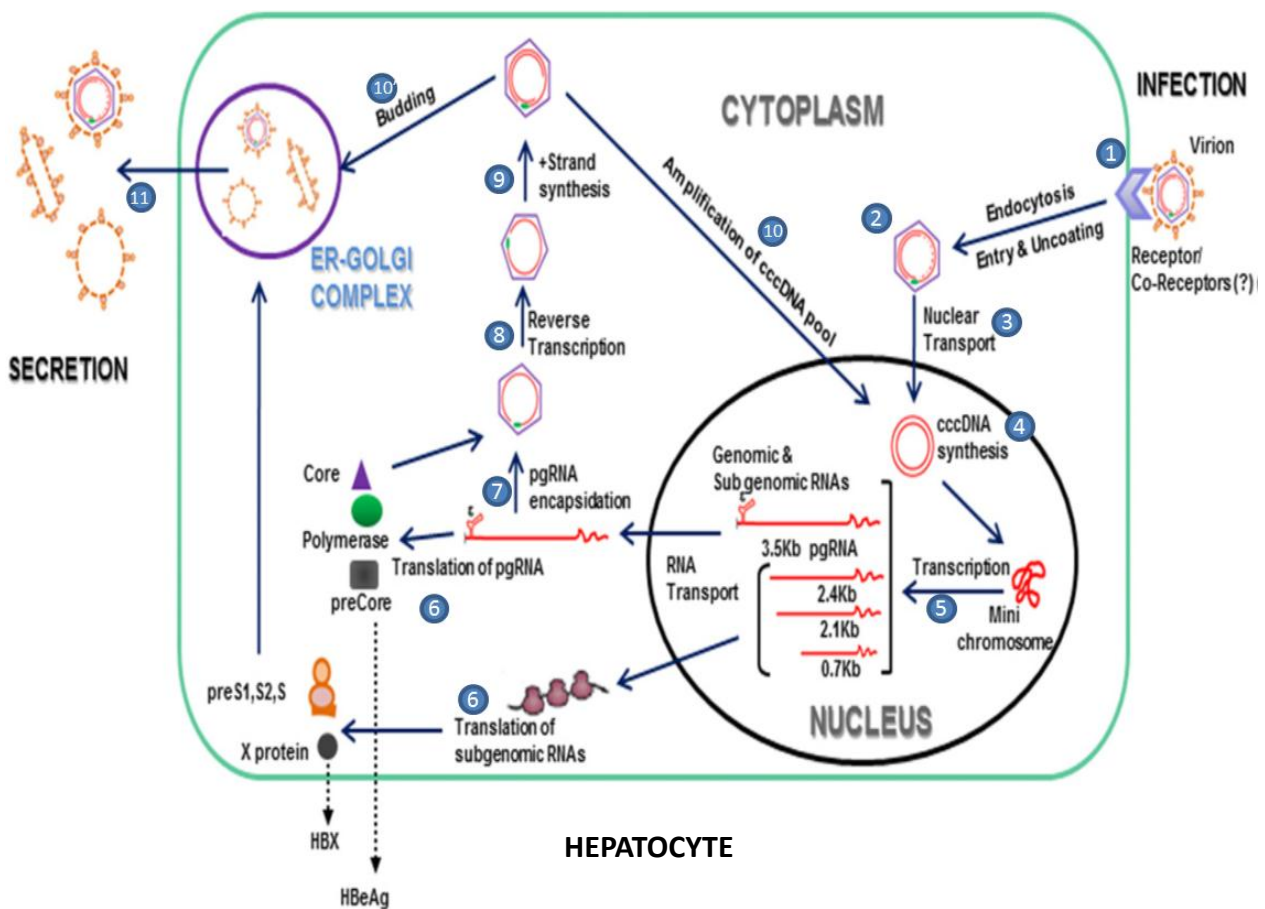
La polymérase virale va ensuite induire la synthèse partielle du second brin d'ADN (de polarité positive), grâce à son activité polymérase ADN-dépendante (**S. Datta, et coll., 2012**).

### **2.3.7 Devenir des capsides virales**

Les capsides contenant l'ADN viral poursuivent un processus de maturation ; une fois matures, elles peuvent suivre deux voies différentes :

- soit un recyclage vers le noyau pour amplifier la formation initiale d'ADN superenroulé;
- soit un enveloppement (après passage dans le réticulum endoplasmique) et une libération hors de la cellule, par bourgeonnement, sous forme de virions infectieux qui pourront alors infecter de nouveaux hépatocytes.

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 (**S. Datta, et coll., 2012**).



**Figure 4: Cycle de réplication du VHB**

1) Fixation et entrée du virus 2) Libération de la nucléocapside virale 3) Transport de la nucléocapside vers le noyau 4) Synthèse de l'ADNccc 5) Transcription virale 6) Traduction des ARNm 7) Encapsidation de pgARN 8) Transcription inverse 9) Synthèse du brin plus d'ADN 10) recyclage de la nucléocapside vers le noyau 10') Bourgeonnement des particules virales 11) Sécrétion (**S. Datta, et coll., 2012**)

## 2.4 Variabilité génétique du VHB

L'infection par le VHB est caractérisée par des niveaux élevés de production virale (environ  $10^{11}$  néovirions synthétisés par jour). (M. A. Nowak et coll., 1996) Ceci favorise la variabilité génétique du virus qui est liée aux caractéristiques de son ADN polymérase. Il s'agit d'une enzyme possédant une activité transcriptase inverse sans activité 3'-5' exonucléasique, les erreurs qu'elle induit lors de la phase répliquative ne sont donc pas corrigées (K. Kidd-Ljunggren et coll., 2002, M. Servant-Delmas, et coll., 2007). Le taux de mutations générées lors de la réplication est estimé entre 1,4 et  $3,2 \cdot 10^{-5}$  substitutions par site et par an dans le cadre d'une infection chronique (H. Okamoto et coll., 1987). Les variants ainsi produits vont coexister avec le virus majoritaire. Les mutants qui ne sont pas défectifs, seront sélectionnés s'ils bénéficient d'un avantage répliquatif par rapport au virus sauvage sous la pression de sélection exercée par le système immunitaire, le vaccin ou les traitements antiviraux. Néanmoins, l'évolution génétique est limitée par la structure compacte du génome et la présence de cadres de lectures chevauchants.

### 2.4.1 Sérotypes

Cette variabilité génétique est à l'origine de la diversification du génome viral : la diversité des souches du VHB se situe essentiellement, quoique non exclusivement, au niveau de l'AgHBs. La nature des acides aminés composant cet antigène conditionne un certain nombre de déterminants antigéniques bien spécifiques (M. Servant-Delmas, et coll., 2007). Le principal déterminant antigénique est dénommé « a », et est commun à toutes les souches virales. On retrouve également des déterminants mutuellement exclusifs « d » et « y » dans la protéine de surface, ainsi que « w » et « r » (S. Datta, et coll., 2012).

Par la combinaison de ces différentes spécificités antigéniques à l'intérieur desquelles figurent des sous-catégories (w1, w2, w3, w4), 9 sérotypes ont été caractérisés : ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+ et adrq- .

### 2.4.2 Génotypes

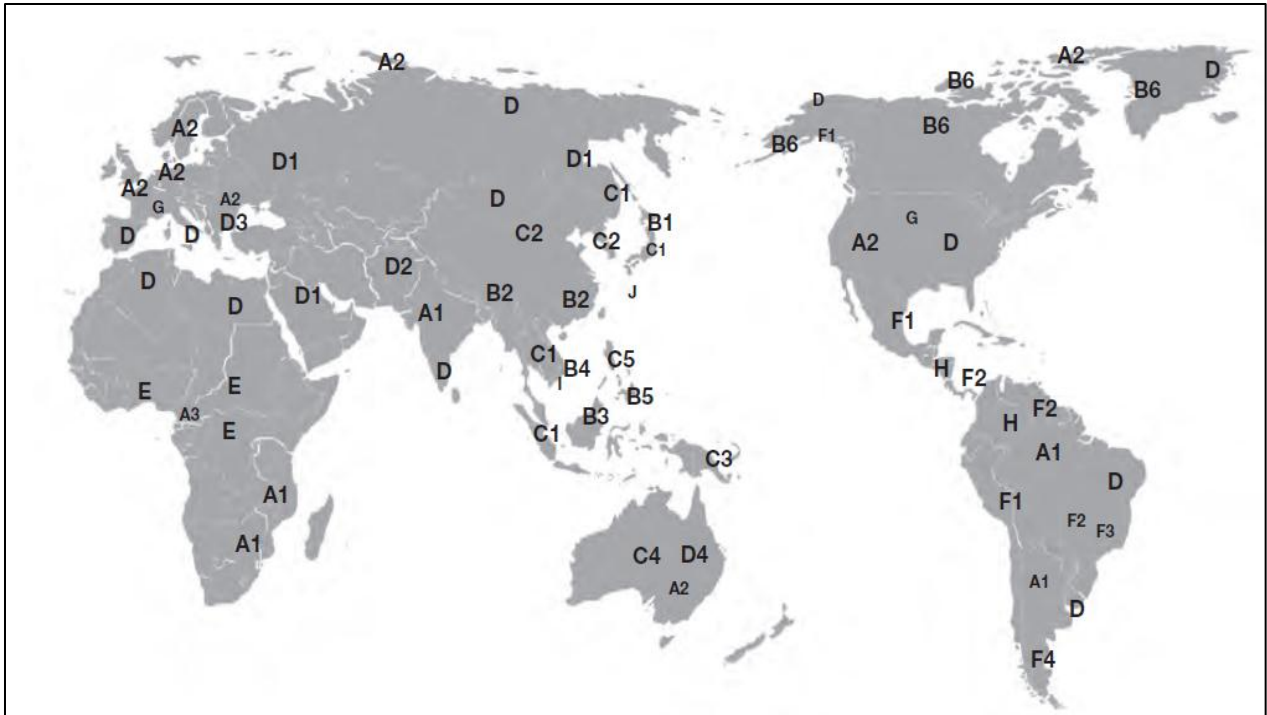
L'analyse des séquences nucléotidiques dérivant d'individus de différentes régions géographique génétiques a révélé la présence de 10 génotypes de A à J. Cette classification repose sur une divergence nucléotidique d'au moins 8 % sur le génome complet. Les deux

derniers génotypes, I et J, ont été récemment identifiés comme souches recombinantes du VHB, rapportées du Vietnam et du Japon respectivement. **(K. Tatematsu et coll., 2009, T. T. Tran et coll., 2008)**. Par la suite, des analyses phylogénétiques plus poussées et des séquençages du génome du VHB provenant de différentes parties du globe ont conduit à une classification plus profonde des génotypes en sous-types, basée sur une divergence nucléotidique de plus de 4%, mais inférieure à 8%.

A l'heure actuelle, 7 sous-types du génotype A, 9 sous-types du génotype B, 16 sous-types du génotype C, 9 sous-types du génotype D et 4 sous-types du génotype F ont été décrits. **(S. Ghosh et coll., 2013, W. Shi et coll., 2013)**

La répartition géographique des génotypes et sous-types du VHB n'est pas homogène (Figure 5). En effet, les génotypes A (A1: surtout en Afrique et en Inde ; A2: en Europe et Etats-Unis ; A3 en Afrique de l'Ouest), D1 à D4 ont une distribution mondiale avec une prédominance dans la région Méditerranéenne, les génotypes B et C se trouvent principalement en Asie de l'Est et du Sud Est et en Australie. Le génotype E est prédominant en Afrique occidentale, et les sous types F1/F2 se trouvent exclusivement chez les peuples autochtones en Amérique centrale et en Amérique du Sud. Le génotype G est retrouvé en Europe et aux Etats-Unis ; le génotype H est uniquement retrouvé en Amérique centrale et du Sud. **(W. Shi, et coll., 2013)**

Au Sénégal, une étude réalisée en 2006 à l'Hôpital Principal de Dakar **(M. Vray et coll., 2006)** a démontré la prédominance du génotype E dans la population sénégalaise, mais également l'importance du génotype A, ce dernier se trouvant surtout chez des sujets plus jeunes. Cette étude montra aussi la fréquence des mutants pré-core dans la population, associée à une faible répllication virale.



**Figure 5: Répartition géographique des génotypes et sous-types du VHB**

La taille des lettres représente la prévalence du génotype dans chaque région, avec une prévalence élevée du génotype représenté avec une police plus grande. (B. K. Kim et coll., 2011)

### 2.4.3 Recombinaisons

Les mouvements de populations favorisent le brassage des génotypes ainsi que les infections multiples par plusieurs génotypes. Des co-infections ont été décrites avec plusieurs génotypes dont la fréquence pourrait être de l'ordre de 10 %. Ces infections mixtes peuvent être à l'origine de phénomènes de recombinaison ; ces derniers constituent l'une des conséquences de la variabilité du VHB. Les principales recombinaisons décrites à ce jour impliquent les génotypes A et D, B et C, ainsi que C et D. Les sites favorables de recombinaison sont fréquemment localisés à l'extrémité 3' du gène S, dans la région 5' du gène précore/core, à l'extrémité 3' du gène C et à la jonction préS1/préS2 (M. Servant-Delmas, et coll., 2007)

### 2.4.4 Mutations du VHB

Il existe de nombreuses mutations dans le génome du VHB ; elles touchent plusieurs parties du génome.

#### **2.4.4.1 Mutants du gène S**

Les substitutions d'acides aminés dans le déterminant «a» de l'antigène HBs peuvent entraîner des modifications conformationnelles qui peuvent affecter la liaison des anticorps neutralisants. Par conséquent, ces mutants peuvent échapper aux anticorps neutralisants induits par la vaccination ou transférés par immunothérapie passive.

La mutation la plus fréquente est celle qui induit, dans la séquence en acides aminés, une substitution d'une Glycine par une Arginine en position 145 de la petite protéine de l'enveloppe virale (G145R). Elle correspond à une mutation ponctuelle de G en A en position nucléotidique 587 (**W. F. Carman et coll., 1990, C. J. Oon et coll., 1995, M. Servant-Delmas, et coll., 2007**).

Les mutations au niveau du gène S peuvent compromettre le dépistage de l'Ag HBs par des trousse commerciales, donnant ainsi des résultats faussement négatifs. D'où l'importance capitale de la recherche du marqueur anti-HBc pour assurer un diagnostic meilleur, et/ou la recherche de l'ADN du HBV par des techniques sensibles de PCR.

#### **2.4.4.2 Mutants du gène préC-C**

La mutation la plus fréquemment décrite dans la région précore (PC) est la mutation G1896A, située au niveau de la structure epsilon. Elle induit la formation d'un codon stop au niveau du 28<sup>e</sup> codon, empêchant ainsi la synthèse de l'Ag HBe. Les infections chroniques par ces mutants apparaissent donc Ag HBe négatif avec le plus souvent une augmentation de la réplication virale.

Dans la région du promoteur basal du core (PBC), la double mutation (A1762T-G1764A) est la plus courante et est associée à une baisse de la synthèse de l'Ag HBe suite à une réduction significative de la transcription de l'ARNm du précore et du core. (**A. Kramvis et coll., 1999**)

### **3 Epidémiologie de l'hépatite B**

#### **3.1 Répartition géographique de l'hépatite B**

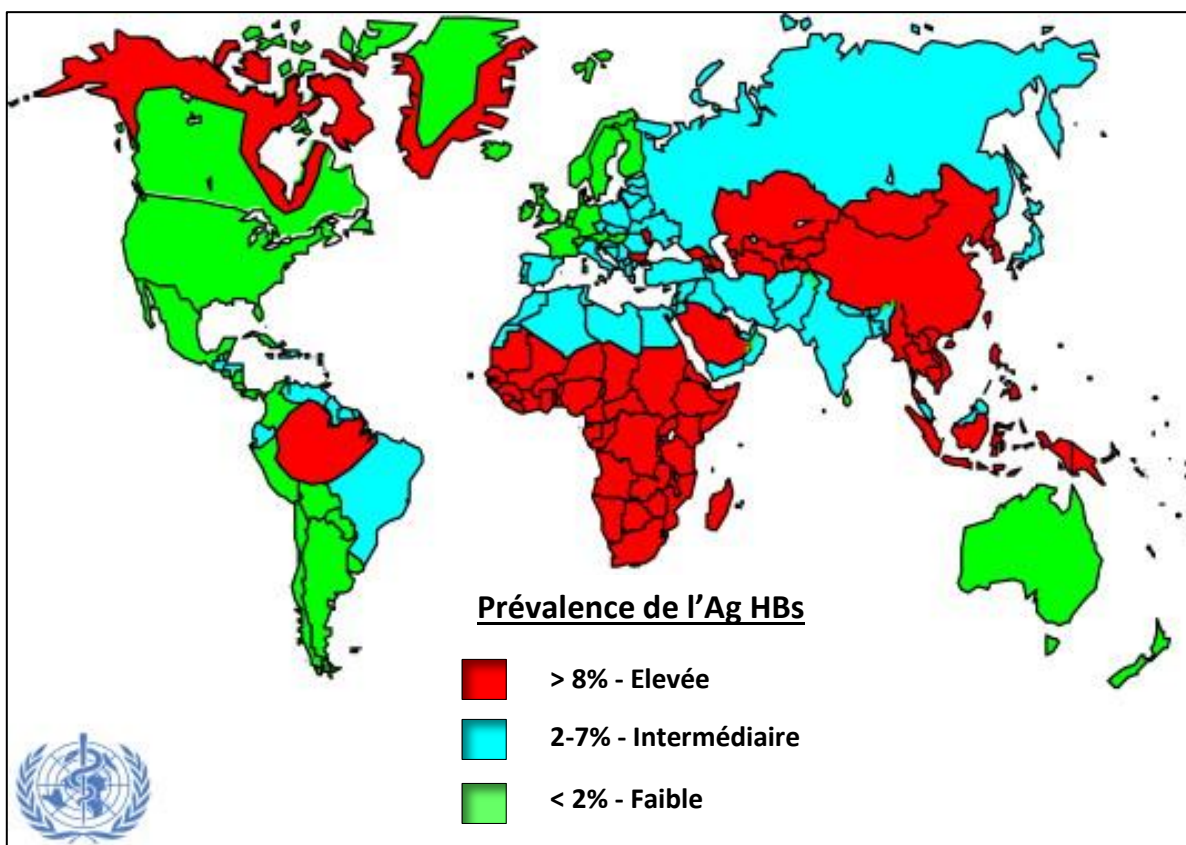
Le nombre de personnes infectées par le virus de l'hépatite B dans le monde est estimé à 2 milliards, dont plus de 370 millions de personnes souffrent d'une infection hépatique



chronique. De plus, près de 600 000 personnes meurent chaque année des conséquences aiguës ou chroniques de l'hépatite B. (OMS, 2012, Institut Pasteur, 2013)

Dans le monde, on distingue 3 zones d'infection de prévalence variable (Figure 6) :

- Des zones de faible endémicité tel que les Etats-Unis, l'Europe du Nord, l'Australie, et certaines régions d'Amérique du Sud, où la prévalence est inférieure à 2%
- Des régions à prévalence intermédiaire : c'est le cas du Moyen Orient, de certains pays d'Europe de l'Est et le bassin Méditerranéen où le taux de porteurs de l'Ag HBs est compris entre 2 à 8%.
- Des régions à forte prévalence de l'Ag HBs, comme les républiques d'Asie centrale, l'Asie du Sud-Est, l'Afrique sub-saharienne et le bassin d'Amazonie où la prévalence de l'hépatite B est supérieure à 8%;



**Figure 6: Répartition mondiale de la prévalence du portage de l'Ag HBs**

Les différentes couleurs indiquent les prévalences variables selon les régions : on distingue des régions de forte endémie (en rouge) avec une prévalence supérieure à 8%, des zones d'endémie intermédiaire en bleu avec une prévalence de 2-7%, et des zones de faible endémie (en vert) avec une prévalence inférieure à 2%. (D Lavanchy, 2008)

En Afrique, environ 65 millions de personnes sont des porteurs chroniques du VHB (**A. Kramvis, et coll., 2007**).

On distingue deux zones de prévalence différentes :

- L'Afrique du Nord qui fait partie des zones de moyenne endémicité. Par exemple, la prévalence de l'Ag HBs est de 2,15% en Algérie (Enquête Nationale 1998) et est comprise entre 4 et 7% en Tunisie selon les études (**O. Bahri, 2008**).
- L'Afrique Sub-saharienne qui fait partie des zones de haute endémicité où la prévalence de l'Ag HBs est supérieure à 8%. En effet, des études ont montré une prévalence de 24,9% au Mali en 2009 (**S. Dao et coll., 2009**), 18,3% en Mauritanie en 2012. (**W. Mansour et coll., 2012**)

Au Sénégal, le Programme National de Lutte contre les Hépatites (PNLH) a renseigné en 1999 que 85 % de la population Sénégalaise a au moins un marqueur du VHB.

Le PNLH a également estimé à 17% le taux de porteurs chroniques du VHB dans la population; ce taux s'est abaissé à 11% en 2012 d'après le Ministère de la Santé.

En 2011, le Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) estime à 9,6% la prévalence de l'Ag HBs chez les donneurs de sang.

Chez les femmes enceintes, la prévalence de l'Ag HBs est estimée à 11.7% en 2012 (<http://www.hepatitesafrique.org>, <http://www.hepatites.sn/le-pnlh/les-hepatites-au-senegal.html>)

Une étude réalisée au Sénégal en 2004, par Sall Diallo et collaborateurs dans les régions de Thiès et Dakar, sur des enfants âgés de moins de 5 ans, a montré une prévalence de l'infection à HBV de 59.38% avec une prédominance de l'infection chronique par rapport à l'infection aiguë (**A. Sall Diallo et coll., 2004**) .

### **3.2 Modes de transmission du VHB**

Depuis sa découverte, le VHB est connu comme étant transmis par les seringues contaminées par du sang infecté. De tous les fluides corporels, le sang est celui qui contient les concentrations les plus importantes de virus. Cependant, l'Ag HBs est également retrouvé dans d'autres fluides corporels tels que la salive, les sécrétions biliaires et pancréatiques, le sperme, les sécrétions vaginales et les menstrues, le lait maternel et les urines.

Ainsi, il existe différents modes de transmission du virus :

- **La transmission parentérale et nosocomiale**

Des quantités importantes de particules virales sont retrouvées dans la circulation sanguine avec, chez un porteur chronique la présence de  $10^8$  à  $10^9$  virions par ml. La contagiosité sanguine du VHB est 10 fois supérieure à celle du virus de l'hépatite C et 100 fois plus élevée que celle du VIH. En effet, le risque de contamination accidentelle par piqûre souillée, est de l'ordre de 30 % pour le VHB, 3 % pour le VHC et 0,3 % pour le VIH (INSERM, Expertise collective, 1997).

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 par la toxicomanie par voie veineuse. Les toxicomanes restent la population la plus concernée par ce mode de transmission dans les pays occidentaux. Aux Etats-Unis, 15% des sujets nouvellement diagnostiqués pour l'hépatite B sont des usagers de drogue par voie intraveineuse. **(A. Wasley et coll., 2008)**

La transmission nosocomiale peut se faire d'un patient à un autre, d'un patient à un personnel de santé ou vice versa.

- **Transmission sexuelle**

Des quantités importantes de virions sont retrouvées dans les sécrétions sexuelles avec environ  $10^7$  virions par ml (INSERM, Expertise collective, 1997).

Une étude réalisée en 1985 démontra l'importante implication de la salive, et du liquide séminal dans la transmission du VHB au cours des contacts hétéro et homosexuels. **(P. Karayiannis et coll., 1985)**

Cette transmission sexuelle est le principal mode de transmission du virus dans les pays de faible prévalence. Aux USA, environ un tiers des sujets nouvellement infectés par le VHB, ont déclaré au moins un facteur de risque sexuel (soit 8% ont un contact sexuel avec une personne connue pour être infectée par le VHB, 34% ont de multiples partenaires sexuels et 15 % sont des MSM (Men Who have Sex with Men). **(A. Wasley, et coll., 2008)**

- **Transmission verticale (périnatale ou materno-foetale)**

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. **(W. J. Edmunds et coll., 1996)**

Cette transmission s'effectue essentiellement au moment de l'accouchement à partir de mères porteuses chroniques du VHB. Ce risque de transmission est d'autant plus fort que la mère présente des signes de multiplication du virus : Ag HBe, titre élevé d'ADN du VHB dans le sérum. En effet, 85% des enfants nés de mères possédant l'Ag HBe deviennent des porteurs chroniques, alors que 31% seulement le deviennent lorsque la mère ne possède pas l'Ag HBe **(R. P. Beasley et coll., 1977)**. De plus, l'étude réalisée par Bahn et collaborateurs en 1995 en Allemagne, confirmée plus tard en 2004 par Friedt et coll. en Suisse, suggère une sélection des mutants pré-core chez les nouveaux nés parmi les différents variants transmis ; ces mutants ont été associés au développement d'hépatite B fulminante chez l'enfant. **(A. Bahn et coll., 1995, M. Friedt et coll., 2004)**

- **Transmission horizontale**

De nombreuses études suggèrent que la transmission horizontale est le mode prédominant en Afrique.

La transmission horizontale se produit essentiellement chez les enfants à travers des lésions cutanées mineures et le contact étroit entre les enfants notamment dans les crèches et à l'école **(L. G. Davis et coll., 1989)**. Le VHB peut être transmis par des objets partagés tels que les serviettes de bains, les bonbons, les produits de nettoyage dentaire **(F. E. Martinson et coll., 1998)**.

De plus, une étude réalisée sur des gibbons a montré que la salive peut servir de véhicule pour la transmission du VHB.

L'infectiosité potentielle de l'urine et de la salive peut fournir une explication pour 20% des cas d'infection obtenus par transmission horizontale pour lesquels l'origine de l'infection est inconnue à ce jour **(A. A. van der Eijk et coll., 2005)**

Une étude réalisée en 2012, sur des souris avec un foie humain chimérique, avait prouvé l'infectiosité des larmes. Ce fluide corporel est ainsi impliqué dans la transmission horizontale du VHB **(H. Komatsu et coll., 2012)**.

Même si la transmission par les fluides corporels autre que le sang est possible, elle reste moins importante que les autres modes tels que la transmission périnatale ou sexuelle. **(L. G. Davis, et coll., 1989)**

- **Transmission par transplantation d'organe**

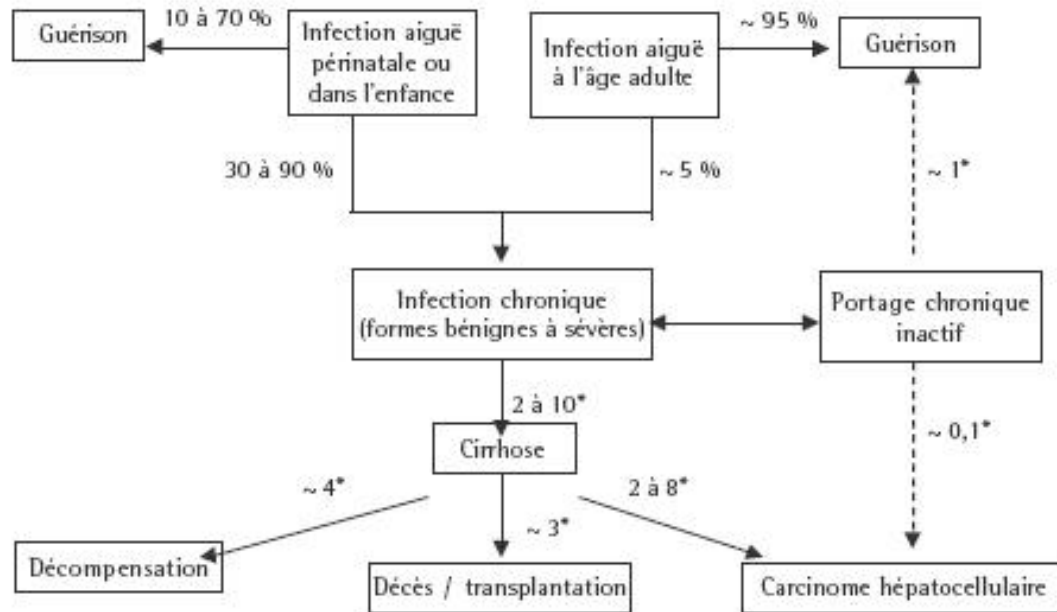
La transplantation d'organe d'un donneur infecté par le VHB présente un risque de contamination du receveur d'organe. En 1997, une étude effectuée par Dickson et ses collaborateurs aux Etats-Unis a démontré que même les donneurs de foie présentant une sérologie négative pour l'Ag HBs et positive pour l'anticorps anti-HBc risquent de transmettre l'infection. Ceci suggère que le virus persiste dans le foie du malade malgré une résolution sérologique **(R. C. Dickson et coll., 1997)**.

De même, le risque de transmission du virus par une transplantation de rein d'un donneur infecté dépend de la sérologie du donneur. S'il présente une sérologie Ag HBs positif, le risque de transmission du virus au receveur est élevé, par contre elle est moindre dans le cas d'absence de l'Ag HBs et de la présence d'IgG anti-HBc. **(S. N. Natov et coll., 2002)**

Dans les zones d'endémicité intermédiaire et forte, les principaux modes de transmission restent la transmission verticale et horizontale. **(E. Franco et coll., 2012)**

#### **4 Histoire naturelle de l'infection par le VHB**

Le virus de l'hépatite B n'est pas cytopathogène par lui-même. En effet, la physiopathogénie de l'hépatite B est essentiellement immunomédiée. La réponse immunitaire, en particulier cellulaire induit la nécrose hépatocytaire par reconnaissance des antigènes viraux exprimés sur la membrane des hépatocytes. Ces mécanismes pathogéniques où l'interaction hôte-virus a un rôle central, rendent compte de la diversité de présentation de cette hépatite.



\* incidence pour 100 personnes années

Source : 2002 EASL international consensus conference on hepatitis B

Figure 7: Histoire naturelle de l'infection par le VHB. (R. de Franchis et coll., 2003)

## 4.1 Infection aiguë par le VHB

### 4.1.1 Forme classique

La période d'incubation de l'hépatite B varie de 2 semaines à 4 mois. (H. M. Elgouhari et coll., 2008)

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 (G. Fattovich, 2003).

Dans la forme classique, une phase pré-ictérique est observée ; elle dure 3 à 7 jours et se manifeste par des symptômes non spécifiques tels que la fatigue, malaises, anorexie, douleurs au niveau du quadrant supérieur droit ou de syndrome grippal. Les premiers marqueurs sérologiques de l'infection aiguë sont l'Ag HBs, les anticorps anti-HBc (IgM) et l'Ag HBe qui est le signe de la réplication virale.

Puis un ictère apparaît et dure généralement 2 à 3 semaines. Durant cette phase ictérique, il apparaît sur le plan biologique une augmentation de l'activité des ALAT (plus de 10 à 30 fois les valeurs normales) et une augmentation discrète de la bilirubine.

La résolution de l'hépatite B se produit dans environ 95% des cas chez les patients adultes, dans 20-50% chez les petits enfants, alors qu'elle ne se produit que dans 10% des cas lorsque l'infection aiguë est périnatale. Durant cette phase de guérison, il y a une disparition de l'AgHBs et des anticorps anti-HBc de classe IgM et une apparition d'anticorps anti-HBs et anti-HBc de classe IgG. L'antigène HBe disparaît et les anticorps anti-HBe apparaissent. **(H. M. Elgouhari, et coll., 2008, P. Stanislas, 2007).**

Cependant, même chez les patients positifs pour les anticorps anti-HBs et anti-HBc, l'ADN du VHB peut persister de façon permanente sous la forme d'ADNccc. Ainsi, de petites quantités d'ADN viral peuvent être détectées par PCR dans le sérum ou dans le plasma. L'éradication complète ne se produit que rarement. L'immunosuppression peut alors entraîner une réactivation du virus, par exemple, après transplantation d'organe ou lors de la chimiothérapie. **(Y. F. Liaw et coll., 2009, S. Mauss et coll., 2012)**

#### **4.1.2 Forme fulminante**

Le VHB est la cause la plus fréquente dans le monde d'hépatite fulminante d'origine virale. Elle complique environ 1 % des hépatites aiguës B symptomatiques et est définie par l'apparition d'une encéphalopathie hépatique caractérisée par une inversion du rythme nyctéméral, un astérisis et un syndrome confusionnel, associés à une diminution du taux de prothrombine (TP < 30%) et du facteur V de coagulation, ayant comme conséquence des hémorragies cutanéomuqueuses **(P. Stanislas, 2007)**. L'hépatite B fulminante est considérée comme étant due à une lyse massive et immunomédiée des hépatocytes infectés **(S. Mauss, et coll., 2012)**, et à une clairance virale rapide. C'est pourquoi, l'Ag HBs et l'ADN viral peuvent être indétectables au moment de la présentation clinique, et le diagnostic n'est effectué que par la présence d'anticorps anti HBc dans le sérum **(Y. F. Liaw, et coll., 2009)**.

#### **4.1.3 Passage à la chronicité**

Le problème principal de l'infection virale B, est celui du passage à la chronicité. Le risque de passage à une infection chronique décroît avec l'âge du patient au moment de l'infection. Chez les sujets adultes, le taux de passage à la chronicité est inférieur à 5% ; il est estimé à

90 % chez les nourrissons infectés à la naissance, et entre 20-50% chez les enfants âgés de 1 à 5 ans (**S. Mauss, et coll., 2012**)

## 4.2 Infection chronique par le VHB

Classiquement, l'infection chronique par le VHB est définie par la persistance de l'Ag HBs, 6 mois après l'hépatite aiguë.

L'évolution naturelle de l'hépatite B chronique dans l'organisme consiste en 5 phases : la phase de tolérance immunitaire, la clairance immunitaire, le portage inactif, la phase de réactivation de l'hépatite B, et la phase de contrôle immunitaire. Ces phases résultent de l'interaction entre le virus, les hépatocytes et la réponse immunitaire du patient.

### Phase de tolérance immunitaire

Les mécanismes de la première phase de tolérance immunitaire ne sont pas encore bien connus. Une étude chez la souris suggère que le transfert transplacentaire de l'Ag HBe maternel durant la grossesse pourrait induire une absence de réponse spécifique des lymphocytes T auxiliaires contre l'Ag HBe, chez le nouveau-né (**Y. F. Liaw, et coll., 2009**): l'Ag HBe agit alors comme une protéine de tolérance immunitaire qui rend le virus indétectable par le système immunitaire de l'hôte. Cette phase est caractérisée par la présence dans le sérum, de l'Ag HBe, avec des niveaux élevés d'ADN viral (généralement plus de 20.000 UI / ml ( $10^5$  copies / ml) et dépassant souvent 20 millions UI / ml ( $10^8$  copies / ml)), des niveaux normaux d'ALAT sérique et une histologie du foie proche de la normale.

Cette phase dure généralement 10 à 30 ans chez les enfants infectés par transmission périnatale d'une mère positive pour l'Ag HBe; par contre elle est très courte, voire absente, chez les patients présentant une infection chronique acquise tardivement dans l'enfance ou à l'âge adulte. (**B. K. Kim, et coll., 2011**)

### Phase de clairance immunitaire

Cette phase est également appelée « phase d'hépatite chronique à Ag HBe positif ». Au cours de cette phase, le système immunitaire de l'hôte reconnaît le virus comme étranger et



déclenche une réponse immunitaire entraînant ainsi une lyse immunomédiée des hépatocytes. Cette phase de clairance immunitaire pourrait être déclenchée par une réorientation de l'expression de l'Ag HBc, du noyau vers le cytoplasme des hépatocytes.

Elle est marquée par une multiplication du virus (cependant moins importante par rapport à la 1ère phase), des taux élevés de transaminases (notamment les ALAT) et une inflammation active hépatique avec ou sans fibrose du foie **(B. K. Kim, et coll., 2011)**. L'évaluation de l'activité cellulaire et de la fibrose se fait au moyen du score histologique appelé le score de METAVIR. (Annexe 1)

La phase de clairance immunitaire peut aboutir à une séroconversion HBe avec un contrôle de la multiplication virale (niveaux indétectables d'ADN viral) et une éventuelle normalisation des taux d'ALAT. Cette séroconversion peut se produire spontanément ou suite à un traitement antiviral, et permet de réduire le risque de progression de la maladie (ainsi que la décompensation hépatique) et améliore donc la survie.

La séroconversion spontanée, annuelle, de l'Ag HBe est estimée à 2-15% et est fonction de facteurs tels que l'âge, les concentrations d'ALAT, le génotype VHB et la zone géographique. **(Y. F. Liaw, et coll., 2009)**. En Afrique, chez la majorité des patients, elle survient à un âge précoce, avant d'atteindre l'âge adulte. Cette séroconversion concerne surtout les génotypes A et D où on peut observer 3 mutations au niveau du codon d'initiation dans la zone précore ; ceci peut alors accélérer la disparition de l'Ag HBe **(B. K. Kim, et coll., 2011)**.

### Le portage inactif

La séroconversion de l'AgHBe est généralement suivie d'une troisième phase de portage inactif, caractérisée par la négativité de l'Ag HBe, des niveaux indétectables ou bas d'ADN viral, des niveaux normaux d'ALAT, et une histologie normale du foie avec une fibrose minime. La probabilité d'une conversion spontanée de l'état actif au portage inactif est d'environ 10-15% par an.

Cependant, ces porteurs inactifs doivent être surveillés puisque 4-20% d'entre eux redeviennent positifs pour l'Ag HBe au moins une fois, avec des niveaux élevés d'ADN viral et d'ALAT sériques, ce qui signifie un retour à la phase de clairance immunitaire.

Ces porteurs inactifs peuvent également évoluer soit vers une phase de réactivation, soit vers une phase de contrôle immunitaire **(B. K. Kim, et coll., 2011)**.

## Phase de réactivation

Bien que la majorité des patients reste dans la phase inactive, 10-30% d'entre eux subissent une phase de réactivation (hépatite chronique à Ag HBe négatif). Ce phénomène est supposé être dû à la persistance de l'ADNccc dans les hépatocytes. Cette réactivation peut survenir soit spontanément, soit suite à une immunosuppression active.

Bien que cette réactivation puisse survenir dans le cas d'infection par un virus sauvage (il s'agit dans ce cas d'un retour au statut d'hépatite chronique à Ag HBe positif), elle est cependant beaucoup plus fréquente dans le cas de souches mutantes (mutants pré-C) présentant des mutations au niveau de la région pré-core ou du promoteur core empêchant l'expression de l'Ag HBe. Par conséquent, cette phase de réactivation (hépatite chronique à Ag HBe négatif), est caractérisée par des niveaux d'ADN viral compris entre 200-20 000 000 UI / ml ( $10^3$  - $10^8$  copies / ml), une augmentation du taux d'ALAT et une nécro-inflammation modérée ou sévère avec une fibrose variable à la biopsie hépatique.

L'incidence de l'hépatite chronique à Ag HBe négatif est en hausse dans le monde ; elle est prépondérante en Europe Méditerranéenne et en Afrique avec plus de 85% de porteurs chroniques à Ag HBe négatif.

Dans ce groupe de patients (Ag HBe négatif), le pronostic à long terme est moins favorable, avec une progression plus rapide vers la cirrhose et le développement fréquent de CHC, comparé aux patients atteints d'hépatite chronique à Ag HBe positif (**B. K. Kim, et coll., 2011**).

## Phase de contrôle immunitaire.

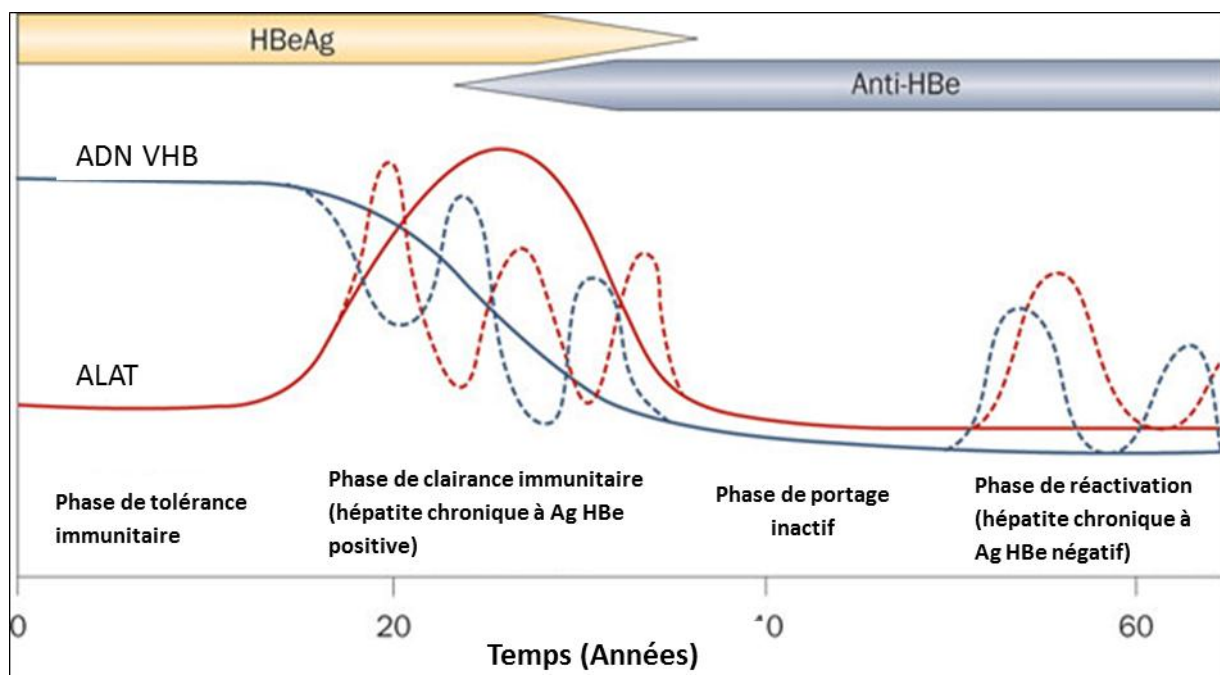
Une petite partie des porteurs inactifs présente une séroconversion « s » définie par la perte de l'Ag HBs et l'apparition des anticorps anti-HBs : c'est la phase de contrôle immunitaire.

Les facteurs prédictifs de la clairance de l'Ag HBs sont en âge avancé et la présence d'une phase inactive maintenue. De plus certaines études ont démontré que certains génotypes présentaient plus de chance de séroconversion par rapport aux autres.

Le taux annuel de clairance spontanée de l'Ag HBs est estimé à 0.5-2% chez les patients occidentaux qui acquièrent l'infection chronique au cours de l'adolescence et de l'âge adulte, et ce taux est de 0.1-1% chez les patients ayant acquis cette infection très tôt (Africains, Asiatiques).

Cette phase est caractérisée par une amélioration de la clinique (par rapport aux sujets HBs positifs), notamment une amélioration de l'inflammation et de la fibrose hépatique.

Malgré un pronostic généralement favorable, la séroconversion ne signifie pas «guérison» ou éradication du VHB. Presque tous les patients présentant une séroconversion HBs portent encore l'ADN viral sous forme d'ADNccc, dans les noyaux des hépatocytes infectés. Ce phénomène est appelé infection occulte du VHB, définie par la négativité de l'Ag HBs et la présence de l'ADN du VHB dans le foie (avec l'ADN sérique/plasmatisque détectable (<200UI/ml) ou indétectable). La persistance du virus dans le foie peut provoquer une nécro-inflammation faible, mais constante, qui, en présence d'autres facteurs de dommages du foie, peut contribuer au fil du temps à la progression de l'hépatite chronique vers la cirrhose. En outre, l'infection occulte est un facteur de risque important pour le développement HCC. (B. K. Kim, et coll., 2011, G. Raimondo et coll., 2010)



**Figure 8: Evolution des marqueurs sérologiques au cours de l'histoire naturelle de l'infection chronique à VHB**

L'histoire naturelle du VHB consiste en 4 phases : la phase de tolérance immunitaire, la phase de clairance immunitaire (hépatite chronique à Ag HBe positif), la phase de porteur inactif et la phase de réactivation (hépatite chronique à Ag HBe négatif). L'évolution des taux d'ADN du VHB est représentée en bleu (trait plein) sur la figure, et les transaminases ALAT (Alanine aminotransférase) par un trait plein rouge. Les différentes fluctuations sont représentées en pointillés (Adapté des travaux de Lok (A. S. Lok, 2007))

## 4.3 Complications

### 4.3.1 Cirrhose

La cirrhose est un événement crucial dans l'histoire naturelle de l'hépatite chronique B car les complications propres d'hypertension portale et d'insuffisance hépatocellulaire qu'elle entraîne sont en grande partie responsables de la morbidité et de la mortalité liées à cette infection (**P. Stanislas, 2007**). De plus, 30% des cas de cirrhose sont attribuables au VHB (**J. F. Perz, et coll., 2006**). Une étude réalisée par Fattovich et ses collaborateurs, en Italie en 1991, sur 105 patients Ag HBs positifs non traités, montre une progression vers la cirrhose dans 20% des cas sur une période de suivi de 3-7 ans (**G. Fattovich et coll., 1991**).

Chez les patients non traités, le taux annuel de progression vers la cirrhose est estimé à 2-6% pour les patients présentant une hépatite chronique à Ag HBe positif, alors que ce taux s'élève à 8-9% chez les patients présentant une hépatite chronique à Ag HBe négatif.

Cette différence des taux peut être expliquée par le fait que les sujets ayant une hépatite chronique à Ag HBe négatif sont le plus souvent à un stade avancé de la maladie, et sont généralement plus âgés.

Les niveaux élevés d'ADN sériques sont considérés comme étant de bons prédictors de la progression vers la cirrhose, de même que les taux élevés d'ALAT, et des taux abaissés d'albumine sérique et du temps de prothrombine. (**G. Fattovich, et coll., 1991**) D'autres facteurs sont associés à un risque plus important d'évolution vers la cirrhose : le sexe masculin, le génotype C (plus que le génotype B), la surinfection ou la co-infection avec les virus de l'hépatite C ou D, ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la consommation fréquente d'alcool, l'obésité, le diabète sucré (**H. M. Elgouhari, et coll., 2008**). Certains facteurs environnementaux sont également associés à un risque plus élevé de cirrhose ; c'est ainsi qu'en 2008, une étude menée en Gambie par Kuniholm et collaborateurs a montré que l'exposition à l'aflatoxine est associée à une augmentation du risque de cirrhose. L'aflatoxine semble interagir en synergie avec le VHB pour augmenter ce risque. (**M. H. Kuniholm et coll., 2008**)

### 4.3.2 Décompensation hépatique

Une fois la cirrhose établie, les individus peuvent décompenser au fil du temps. Cette décompensation est déterminée par la présence de jaunisse, d'ascite, d'encéphalopathie,

et/ou de varices œsophagiennes. La décompensation hépatique peut survenir de manière brutale, à la suite d'un pic de transaminases, ou bien progressivement, après dégradation lente des fonctions hépatiques.

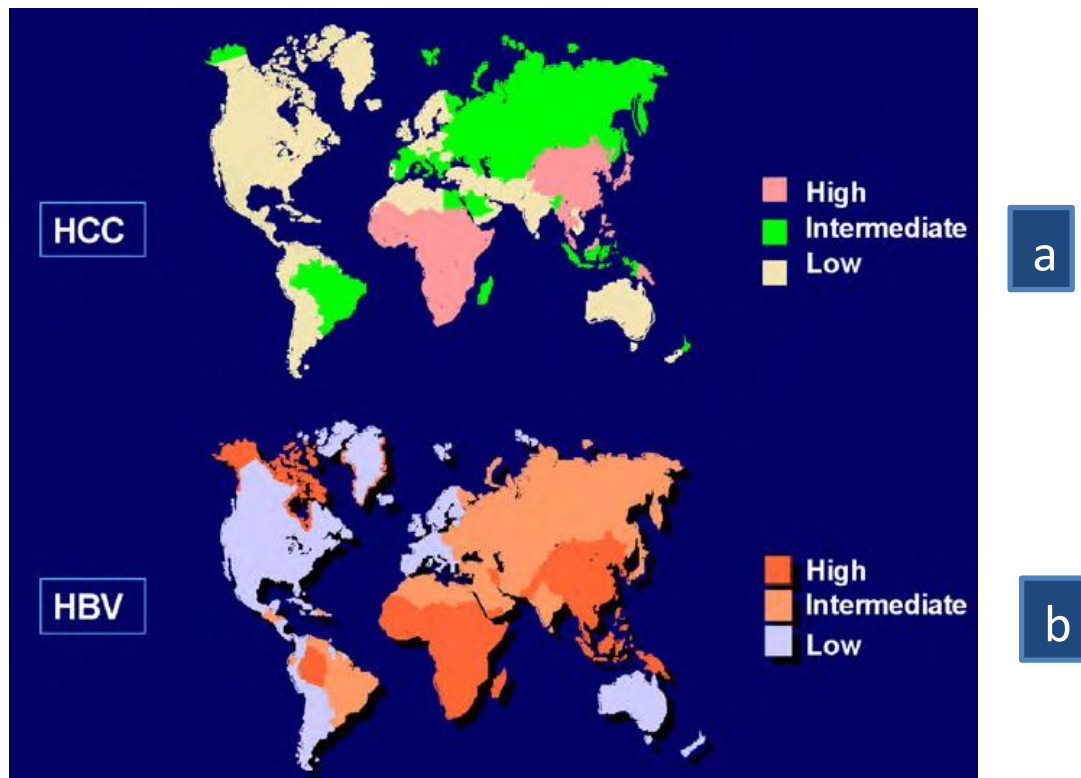
Dans une étude de cohorte européenne (European Concerted Action on Viral Hepatitis, EUROHEP) réalisée sur 297 patients cirrhotiques non traités, avec un suivi médian de 6,6 ans, le risque de décompensation hépatique était 4 fois plus élevé chez les patients ayant une charge virale détectable par rapport aux patients pour lesquels la charge virale est indétectable. Dans cette étude, l'incidence cumulative pour 5 ans, de la décompensation hépatique était de 16%.**(G. Fattovich et coll., 2002)**

### **4.3.3 Carcinome hépatocellulaire**

Le carcinome hépatocellulaire représente le 6<sup>e</sup> cancer le plus fréquent dans le monde et la 3<sup>e</sup> cause de mortalité liée au cancer.**(C. Verslype et coll., 2012)**. De plus, 53 % des cas de CHC sont attribuables au VHB. **(J. F. Perz, et coll., 2006)**.

De même, au Sénégal, le PNLH en 2001 estimait à 80 % la prévalence de l'hépatite B dans les hépatocarcinomes

En effet, une forte corrélation entre l'incidence du CHC et la prévalence de l'Ag HBs ou des anticorps anti-HBc a été mise en évidence lors d'une étude réalisée à Taïwan par Beasley et ses collègues. **(R. P. Beasley, 1988)** La figure 9 illustre bien cette similitude entre la distribution géographique de l'infection chronique à HBV et celle du CHC.



**Figure 9 : La distribution géographique parallèle de l'incidence du CHC (a) et celle de l'infection chronique au VHB (b). (M. C. Kew, 2010)**

Il existe plusieurs facteurs de risque d'évolution vers le CHC, dont le plus important est la cirrhose. Chez les sujets cirrhotiques infectés par le VHB, l'incidence cumulative du CHC sur 5 ans est de 15 % en Asie de l'Est, et de 10 % en Europe. (G. Fattovich et coll., 2004). De plus, il a été observé au cours d'une étude réalisée à Taiwan, que l'incidence du CHC chez les patients Ag HBs positifs, était 3 à 4 fois plus élevée chez les hommes par rapport aux femmes. (Y. T. Huang et coll., 2011)

D'autres facteurs de risque pour le CHC ont été décrits, c'est le cas des niveaux élevés d'ADN viral, une durée d'infection plus longue, l'histoire familiale du CHC, la situation géographique (surtout les Asiatiques et les Africains), le génotype (le génotype C plus atteint que le B), mutations au niveau du promoteur core, la séroconversion HBe, la co-infection par le virus de l'hépatite C, la consommation importante d'alcool, le tabac, l'obésité et le diabète sucré (H. M. Elgouhari, et coll., 2008).

A côté de ces facteurs indirects, certaines études ont suggéré des facteurs viraux directs de l'hépatocarcinogénèse. L'intégration de l'ADN du VHB dans l'ADN cellulaire de l'hôte, dans

certaines situations, agit en perturbant ou en favorisant l'expression de gènes cellulaires. De plus, la protéine HBx a été impliquée dans le CHC (**A. M. Di Bisceglie, 2009, G. Y. Hwang, et coll., 2003, K. Koike, et coll., 1994**).

#### **4.3.4 Hépatite D et complication de l'hépatite B**

Le virus de l'hépatite D ou delta (VHD) est un petit virus à ARN circulaire considéré comme un sous virus satellite, car il ne peut se propager qu'en présence du VHB. La transmission du VHD peut se produire soit par le biais d'une infection simultanée par le VHB (co-infection), soit par infection d'une personne déjà porteuse du virus de l'hépatite B (surinfection). Les porteurs chroniques du VHB présentent un haut risque d'infection par le VHD notamment par transmission percutanée ou sexuelle.

L'évolution de la coinfection VHB/VHD est similaire à l'infection VHB seule, avec un taux de guérison de 95% et une évolution vers la chronicité dans 5% des cas.

Cependant, la co-infection VHB/VHD est responsable d'un taux plus important (17%) d'hépatites fulminantes graves caractérisées par la survenue d'encéphalopathie.

La surinfection VHB/VHD cause généralement une hépatite aiguë sévère évoluant dans 80% des cas vers une hépatite chronique. La surinfection est également associée à une hépatite aiguë fulminante provoquant un taux de mortalité de 80% (**N. Previsani, Lavanchy, D., 2001**).

De plus, Fattovich et ses collaborateurs, dans leur étude, ont trouvé que la surinfection d'une hépatite B chronique par le VHD provoquait une progression plus rapide vers la cirrhose comparé aux sujets mono-infectés par le VHB (**G. Fattovich et coll., 1987**). En effet, la surinfection associée à une hépatite chronique D active évolue dans 60-70% des cas vers une cirrhose (**N. Previsani, Lavanchy, D., 2001**)(**N. Previsani, Lavanchy, D., 2001**).

## **5 Cinétique des marqueurs sérologiques**

### **5.1 Au cours d'hépatites aiguës**

L'Ag HBs est le premier marqueur d'identification de l'infection aiguë (Figure 10). Il est décelé dans le sérum dans les 4-6 semaines suivant la contamination. Les titres de l'Ag HBs

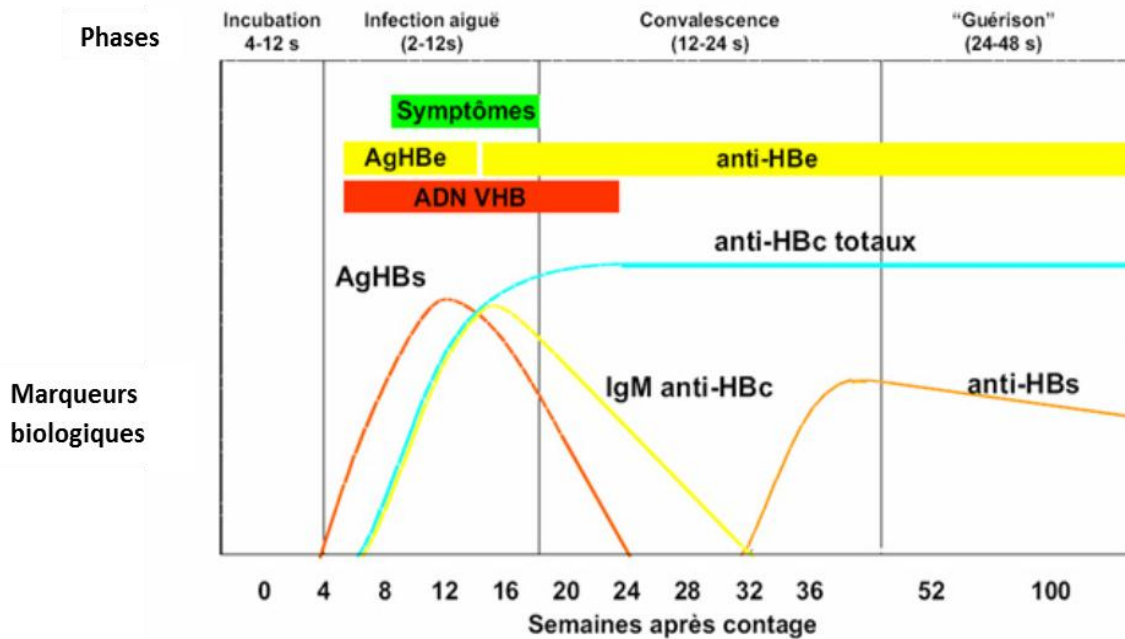
augmentent et un pic est observé au début des signes cliniques ou juste après leur apparition. Généralement, l'Ag HBs persiste pendant 1-5 mois, avec des titres diminuant progressivement puis disparaissant avec l'amélioration et la résolution des symptômes.

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 HBV. 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<sup>e</sup> mois suivant l'infection, alors que les IgG persistent à long terme.

Les antigènes HBe sont décelés dans le sérum 6 semaines après la contamination. Ils sont témoins de répllication virale. La séroconversion de l'Ag HBe en anticorps anti HBe survient vers la quatorzième semaine. Ces anticorps anti-HBe persistent à long terme dans le sérum.

Les anticorps anti-HBs ne sont pas détectés pendant la phase aiguë de la maladie, mais sont observés pendant la période de convalescence. On observe une fenêtre sérologique dans laquelle les Ag HBs ont disparu alors que les Ac anti-HBs ne sont pas encore présents : il est donc utile de doser les anticorps anti-HBc, dont les IgM anti-HBc. Les anticorps anti-HBs persistent à long terme et sont utilisés comme des marqueurs fiables de guérison et d'immunisation contre le VHB. **(J. H. Hoofnagle, 1981, F. J. Mahoney, 1999)**





**Figure 10: Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite B aiguë résolutive.**

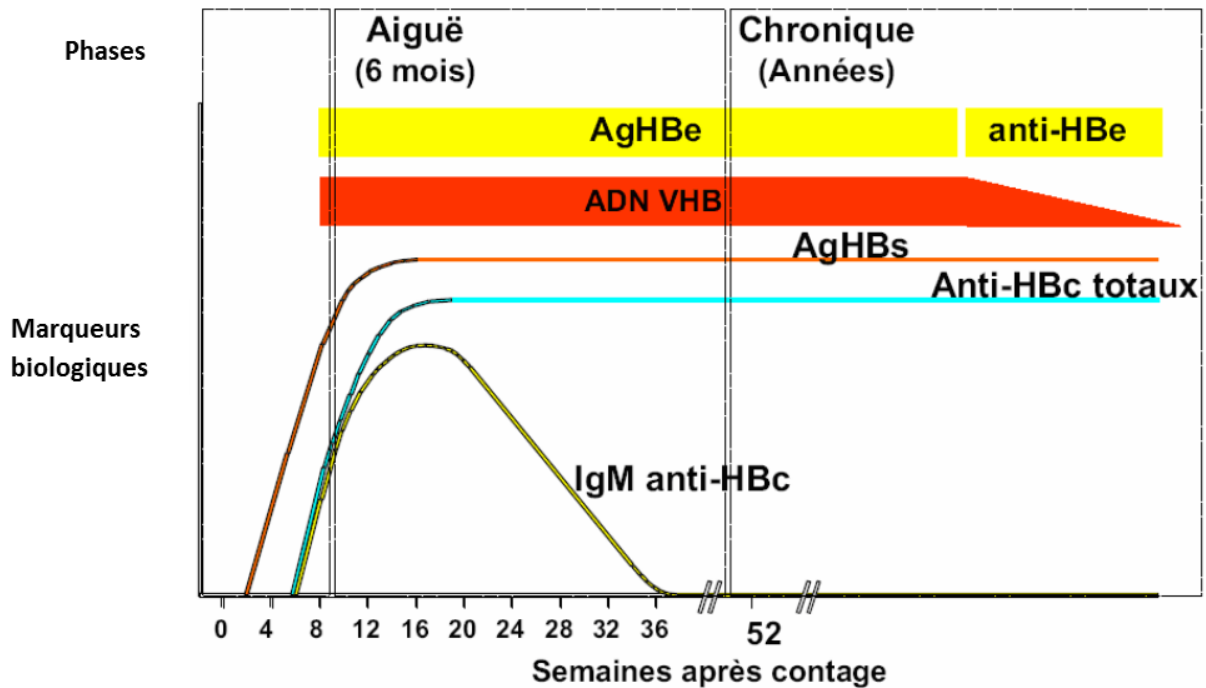
Les barres horizontales vertes, jaunes et rouges représentent respectivement la période symptomatique, l'apparition de l'Ag HBe suivie des anticorps anti-HBe, l'ADN viral. La cinétique de l'Ag HBs (courbe rouge), des IgM anti-HBc (courbe jaune), des anticorps anti-HBc (courbe bleue) et des anticorps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

## 5.2 Au cours d'hépatites chroniques

Environ 5% des sujets adultes infectés par le virus de l'hépatite B vont évoluer vers la chronicité. Cette hépatite chronique est caractérisée par la persistance de l'Ag HBs au-delà de 6 mois. L'évolution des marqueurs sérologiques au cours de l'infection chronique est présentée dans la figure 11.

Les anti-HBc sont trouvés à des taux élevés : les IgM diminuent progressivement et disparaissent au 6<sup>e</sup> mois, alors que les IgG persistent pendant des années voire toute la vie. L'antigène HBs reste détectable dans le sérum à long terme. La durée de la positivité de l'Ag HBe est variable ; en effet la séroconversion «e» peut survenir mais ne s'accompagne pas toujours de la disparition de l'ADN circulant.

L'ADN viral est détectable dans le sérum durant toute la durée de l'infection et témoigne de la réplication virale.(J. H. Hoofnagle, 1981, F. J. Mahoney, 1999)



**Figure 11: 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 (C. Bekondi, 2008)

## 6 Diagnostic et suivi biologiques de l'infection chronique à VHB

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 (Figure 1 A) ; mais cette technique qui nécessite de fortes concentrations de particules virales n'est pas utilisée en routine.

De plus, la culture du virus est possible mais difficile et reste réservée au domaine expérimental.

Le diagnostic de routine de l'infection à VHB est basé sur un diagnostic virologique et un diagnostic moléculaire.

## 6.1 Diagnostic virologique de l'infection à VHB

Il s'agit de la recherche des antigènes viraux et des anticorps spécifiques.

### 6.1.1 Recherche des antigènes viraux

Cette recherche constitue le diagnostic direct (à côté de l'examen microscopique, de la culture et de la détection de l'ADN viral).

En pratique, les Ag HBs et Ag HBe sont mis en évidence dans le sérum par des techniques immuno-enzymatiques de type ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) « sandwich », chez les sujets porteurs du virus. Ces techniques sont basées sur le principe de la capture directe de l'antigène par des anticorps spécifiques.

La phase de capture utilise essentiellement des anticorps monoclonaux humains ou murins, de 1 à 4 anticorps différents suivant les réactifs, fixés sur un support solide (par exemple microplaque ou microparticule). La révélation de la réaction est réalisée par l'intermédiaire d'anticorps marqués, soit polyclonaux, soit monoclonaux.

La recherche de l'Ag HBs peut également être réalisée par des tests rapides reposant sur des méthodes d'agglutination, d'immunofiltration, ou d'immunochromatographie.

L'Ag HBs est un élément essentiel pour le diagnostic d'une infection par le VHB. Il est le premier marqueur sérologique détecté au cours d'une infection aiguë avant l'apparition des premiers symptômes : il peut être détecté en moyenne 1 mois après l'exposition.

Lorsqu'il persiste au-delà de 6 mois, l'infection prend l'attribution de chronique.

L'Ag HBe, codé par les gènes préC-C, est également retrouvé dans le sérum. Il est le signe de la réplication virale active. Cependant dans certains cas (mutants pré-C), l'Ag HBe n'est pas détecté malgré une multiplication importante du virus.

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-peroxydase, lorsqu'une biopsie hépatique est réalisée (**M. Kraiden et coll., 2005, E. E. Mast et coll., 2005**).

### **6.1.2 Recherche des anticorps spécifiques.**

Il correspond au diagnostic indirect : c'est la recherche de la réaction immunologique de l'hôte.

Il s'agit de la détection et éventuellement de la quantification des anticorps dirigés contre les différents antigènes viraux : anticorps anti-HBs, anticorps anti-HBc totaux et la fraction IgM des anti-HBc, et les 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, ou encore elle peut être le signe d'une mutation pré-core/promoteur core. Dans ce dernier cas, les niveaux d'ADN viral sont très élevés.

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 protégé. **(A. D. Jack et coll., 1999, M. Kraiden, et coll., 2005, E. E. Mast, et coll., 2005)**

### **6.1.3 Interprétation des marqueurs sérologiques pour l'infection à VHB**

Les différents profils biologiques qui peuvent être rencontrés au cours de l'infection à VHB sont résumés dans le tableau I.

**Tableau I: Interprétation des résultats de sérologie de l'infection à VHB**

(Adapté de (E. E. Mast, et coll., 2005)

Ag HBs	Anti-HBs	IgM Anti-HBc	Anti-HBc totaux	Ag HBe	Anti-HBe	ADN VHB	Interprétation
-	-	-	-	-	-	-	Sujet jamais infecté, susceptible
+	-	+	+	+	-	+	Hépatite aiguë
+	-	+	+	-	+/-	+/-	Hépatite aiguë résolutive
+	-	-	+	+	-	+	Hépatite chronique (virus sauvage)
+	-	-	+	-	+	+	Hépatite chronique (virus mutant pré-C)
+	-	-	+	-	+/-	-	Porteur sain
-	+	-	-	-	-	-	- Immunisation post-vaccinale - Transfert passif d'immunoglobulines
-	+	-	+	-	+/-	-	Immunisation post-infectieuse (guérison) - Infection ancienne - Infection aiguë en guérison
-	-	-	+	-	-	-	- Faux positif, donc sujet susceptible - Transfert passif à un nouveau-né de mère Ag HBs positive

## 6.2 Diagnostic moléculaire de l'infection à VHB.

Il s'agit de la détection et de la quantification de l'ADN du VHB. La quantification de l'ADN du VHB reflète la réplication virale hépatique et permet de suivre l'évolution de l'hépatite chronique. Cette charge virale peut être mesurée soit par des techniques d'hybridation, soit par amplification génique. Cependant, les techniques d'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) du génome viral sont les plus sensibles.

Dans le sérum/plasma, la détection et la quantification de l'ADN viral nécessite une étape préliminaire d'amplification. Ainsi, il existe deux types de techniques qui permettent soit l'amplification du signal soit l'amplification de la cible.

### **6.2.1 Techniques d'amplification du signal**

Il s'agit des méthodes d'hybridation, et de la méthode de « l'ADN branché » bDNA (branched DNA). Le principe de l'amplification du signal repose sur l'hybridation dans un premier temps du génome viral sur des sondes oligonucléotidiques d'ARN, et les hybrides formés sont capturés par des anticorps anti-hybrides. Puis, des anticorps conjugués se fixent sur les hybrides et le signal émis par fluorescence est amplifié et mesuré. **(J. M. Pawlotsky, 2002)** Quatre tests reposant sur l'amplification du signal sont actuellement commercialisés : trois tests fondés sur l'hybridation, l'HBV Digene Hybrid-Capture I, l'HBV Digene Hybrid-Capture I et l'Ultra-sensitive HBV Digene Hybrid-Capture II (Digene Corp., Gaithersburg, Maryland, Etats-Unis) et un test fondé sur la méthode des « ADN branchés », le Versant™ HBV DNA 1.0 Assay (Bayer corp., Tarrytown, Etats-Unis) **(L. Castera, 2004)**.

### **6.2.2 Techniques d'amplification de la cible**

Elles reposent sur la synthèse au cours d'une réaction enzymatique cyclique d'un grand nombre de copies d'ADN du VHB (amplicons). Ces derniers pourront ensuite être détectés par différentes méthodes et la quantité d'ADN viral dans l'échantillon pourra alors être déterminée. Les techniques d'amplification de la cible sont représentées par la PCR et par la TMA (Transcription-mediated amplification).

#### ***6.2.2.1 Transcription mediated amplification***

C'est une réaction isotherme utilisant 2 enzymes : la transcriptase inverse qui permet la synthèse de l'ADNc double brin et la T7 RNA Polymérase qui effectue la transcription de l'ADN en ARN. Les amplicons obtenus sont de l'ARN simple brin.

Après lyse de l'enveloppe virale, l'ADN viral est capturé par des sondes oligonucléotidiques et se fixe sur des microparticules magnétiques. Chaque ARN nouvellement formé rentre à nouveau dans le processus de TMA et sert de matrice pour la série suivante, résultant en une amplification exponentielle **(J. M. Pawlotsky, 2002)**.

### 6.2.2.2 *Polymerase chain reaction*

Contrairement à la TMA, la PCR utilise plusieurs températures et une seule enzyme (l'ADN polymérase thermostable) et est réalisée après extraction de l'acide nucléique.

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice (appelé ADN cible). Pour initier le processus, un segment d'acide nucléique doit s'y associer afin de servir d'amorce. Les amorces sont de courtes séquences d'oligonucléotides complémentaires aux bornes 5' et 3' de la séquence ciblée.

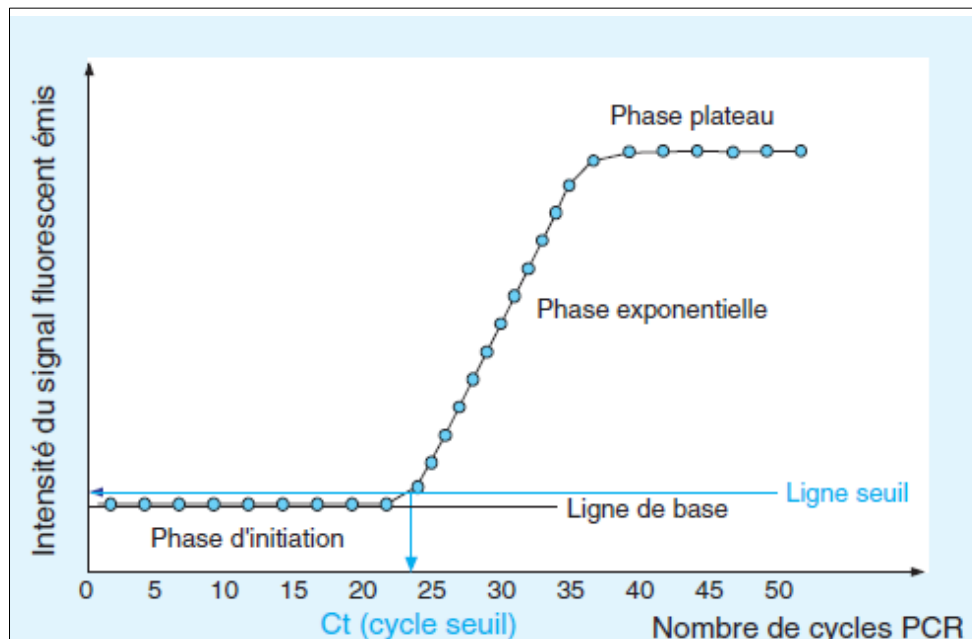
Etant donné que la réaction d'amplification est saturable, ces méthodes ont une plage étroite de quantification. Toutefois, ce problème a alors été résolu par le développement de techniques de PCR en temps réel pour lesquelles la quantification se fait durant la phase exponentielle de la réaction d'amplification.

### 6.2.3 PCR en temps réel

Elle utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée non pas à la fin, mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. L'amplification est réalisée de façon constante à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable. **(E. Poitras et coll., 2002)**

Il s'en suit ensuite une phase plateau, générant très peu d'amplicons. Cette baisse du taux d'amplification résulte en partie de l'inactivation thermique partielle de l'ADN polymérase au cours des derniers cycles et du fait que les produits nécessaires à l'amplification (notamment dNTP et amorces) deviennent limitants. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent (« reporter ») dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (*template*) **(E. Poitras, et coll., 2002)**. Il est alors

possible de tracer une droite (Cf Figure 12) représentant l'intensité du signal fluorescent émis en fonction du cycle.



**Figure 12: Cinétique de la réaction de PCR en temps réel**

Au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de la fluorescence émise est très faible et va permettre de définir la ligne de base de la courbe. Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits de PCR entraîne une variation mesurable de l'intensité de la fluorescence émise.

Le point de départ de la phase exponentielle, est appelé cycle seuil optique noté Ct (*threshold cycle*). Plus précisément, le cycle seuil est le nombre fractionnaire de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise a dépassé une valeur seuil significativement différente du bruit de fond. Le cycle seuil se trouve inversement proportionnel au logarithme du nombre de molécules d'acide nucléique cible initialement présentes avant amplification par PCR. (C. Tse et coll., 2003)

Les technologies de détection utilisées pour la quantification des amplicons sont divisées en 2 groupes : les agents intercalants et les sondes fluorescentes.

- Les agents intercalants

Le système de détection le plus simple repose sur l'utilisation d'un agent intercalant, c'est à dire une molécule capable de s'insérer entre les bases appariées d'un acide nucléique. L'agent intercalant le plus courant est le SYBR Green I qui est un composé organique aromatique de formule chimique  $C_{32}H_{37}N_4S$  faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores) et qui se lie à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. L'augmentation de la fluorescence mesurée pendant l'étape de polymérisation est proportionnelle au nombre



de produits amplifiés formés (amplicons). L'émission fluorescente décroît complètement lors de l'étape de dénaturation du cycle suivant.

- Détection par sondes fluorogéniques

Une sonde fluorogénique est court un fragment d'ADN monobrin, non extensible par l'ADN polymérase, spécifique du fragment cible amplifié et portant un ou deux groupements fluorophores. Un groupement fluorophore est une molécule capable d'absorber de l'énergie lumineuse et ainsi de passer à un état excité, puis de restituer cette énergie sous forme d'une émission fluorescente en retournant à son état initial.

A chaque cycle d'amplification PCR, l'hybridation spécifique d'une sonde fluorogénique sur chaque molécule d'amplicon générée, couplée à une mesure de l'intensité de la fluorescence émise par le groupement fluorophore excité, vont permettre le suivi de la réaction d'amplification.

Les sondes sont généralement marquées à une extrémité par un fluorophore donneur ou reporter (qui est la molécule excitée) et à l'autre extrémité par un fluorophore accepteur ou quencher qui absorbe l'énergie qui lui est transférée par le reporter. **(E. Poitras, et coll., 2002, C. Tse, et coll., 2003)**

- Sondes Taqman ou sondes d'hydrolyse

La sonde taqMan<sup>TM</sup> est un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores en ses extrémités 5' et 3'. L'extrémité 5' porte le fluorophore donneur et à l'extrémité 3', se trouve le fluorophore quencher. Du fait de la proximité des deux groupements fluorophores, l'énergie absorbée par le reporter excité est transférée au quencher. Le spectre d'excitation du quencher ne chevauchant pas le spectre d'émission du fluorophore donneur, le quencher absorbe l'énergie qui lui est transmise mais n'émet aucune fluorescence. La particularité du système TaqMan est d'exploiter l'activité 5'-3' exonucléasique de l'ADN polymérase qui permet d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique lors de l'étape d'élongation des amorces. Le clivage de la sonde au cours de cette étape a pour conséquence d'éloigner les 2 fluorophores, de libérer le reporter de l'effet quenching et ainsi de rétablir son émission de fluorescence. 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 en fin de chaque cycle d'amplification.

**(E. Poitras, et coll., 2002, C. Tse, et coll., 2003)**

- Sondes en tandem ou sondes LightCycler

Le système utilise un couple de sondes d'hybridation très courtes portant chacune un fluorophore. Le reporter utilisé (la fluorescéine) est associé à l'un des fluorophores LC Red 640 et LC Red 705. Le fluorophore donneur a un spectre d'émission se chevauchant avec le spectre d'excitation du fluorophore accepteur. En solution, les deux sondes sont libres et séparées, il n'en résulte aucune fluorescence. Pendant l'étape d'hybridation, les deux sondes se fixent à leurs séquences cibles respectives dans un arrangement en tête-à-queue. La proximité des deux fluorophores permet le transfert énergétique de la fluorescéine verte au fluorophore accepteur rouge, qui ainsi excité, émet à son tour un signal fluorescent mesurable. L'accroissement de la fluorescence rouge est proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé durant la réaction PCR. **(E. Poitras, et coll., 2002, C. Tse, et coll., 2003)**

- Sondes Beacon ou balises moléculaires

Une balise moléculaire est une sonde d'hybridation d'ADN en forme d'épingle à cheveux. Elle possède une structure particulière de type tige boucle. La portion de la sonde qui compose la boucle est complémentaire à la séquence cible d'ADN. Le tronc de la balise moléculaire est formé de deux bras avec des séquences complémentaires. La sonde porte à son extrémité 5' un groupement *reporter* et à l'extrémité 3' un groupement fluorophore non fluorescent qui dissipe en chaleur l'énergie du fluorochrome émetteur.

Les sondes libres adoptent en solution une structure en épingle à cheveux et le tronc maintient les bras ensemble pour une suppression efficace de l'émission de fluorescence. Pendant l'étape d'hybridation, lorsque la sonde rencontre une séquence qui lui est complémentaire, elle adopte une conformation transitoire qui force le tronc à se séparer, libérant ainsi les 2 bras. La sonde s'hybride alors préférentiellement à sa séquence complémentaire cible sur la matrice. Dans cette conformation, le reporter est éloigné de son quencher, restaurant ainsi l'émission de fluorescence qui peut être détectée **(E. Poitras, et coll., 2002, C. Tse, et coll., 2003)**.

## 6.2.4 Expression des résultats de charge virale

Les taux sériques d'ADN viral (ou charge virale) sont reportés en différentes unités (copies/ml, Equivalents/ml, Méga-équivalents/ml ou Unités Internationales UI/ml) selon la technique utilisée et le fabricant du test. L'OMS a donc 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. (Tableau II)

**Tableau II: Conversion des copies d'ADN VHB/ml en UI/ml**  
(Source : adapté des travaux de Locarcini (S. Locarnini et coll., 2004))

TEST	FACTEUR DE CONVERSION
Versant HBV DNA 3.0 (bDNA) (Siemens Diagnostics)	1UI/ml = 5.6 copies/ml
Cobas Amplicor HBV monitor (Roche Molecular Systems)	1UI/ml = 5.6 copies/ml
Cobas Taqman 48 HBV (Roche Molecular Systems)	1UI/ml = 5.8 copies/ml
Real Art HBV PCR assay( Artus-Biotech)	1UI/ml = 5.8 copies/ml
Abbott RealTime HBV m2000	1UI/ml = 3.41 copies/ml

## 6.3 Suivi de l'infection chronique

### 6.3.1 Bilan de base

Pour les patients atteints d'hépatite B chronique, un examen initial doit être effectué pour déterminer de manière précise le stade de l'infection. Cet examen consiste en un bilan hépatique ( $\gamma$ GT, PAL, ALAT, ASAT, bilirubine), un bilan hématologique (hémogramme, TP), recherche de marqueur tumoral (AFP : alpha-foetoprotéine), échographie abdominale, ponction biopsie hépatique (PBH) avec établissement du score METAVIR, diagnostic des co-infections (VIH, VHC, VHD, VHA).

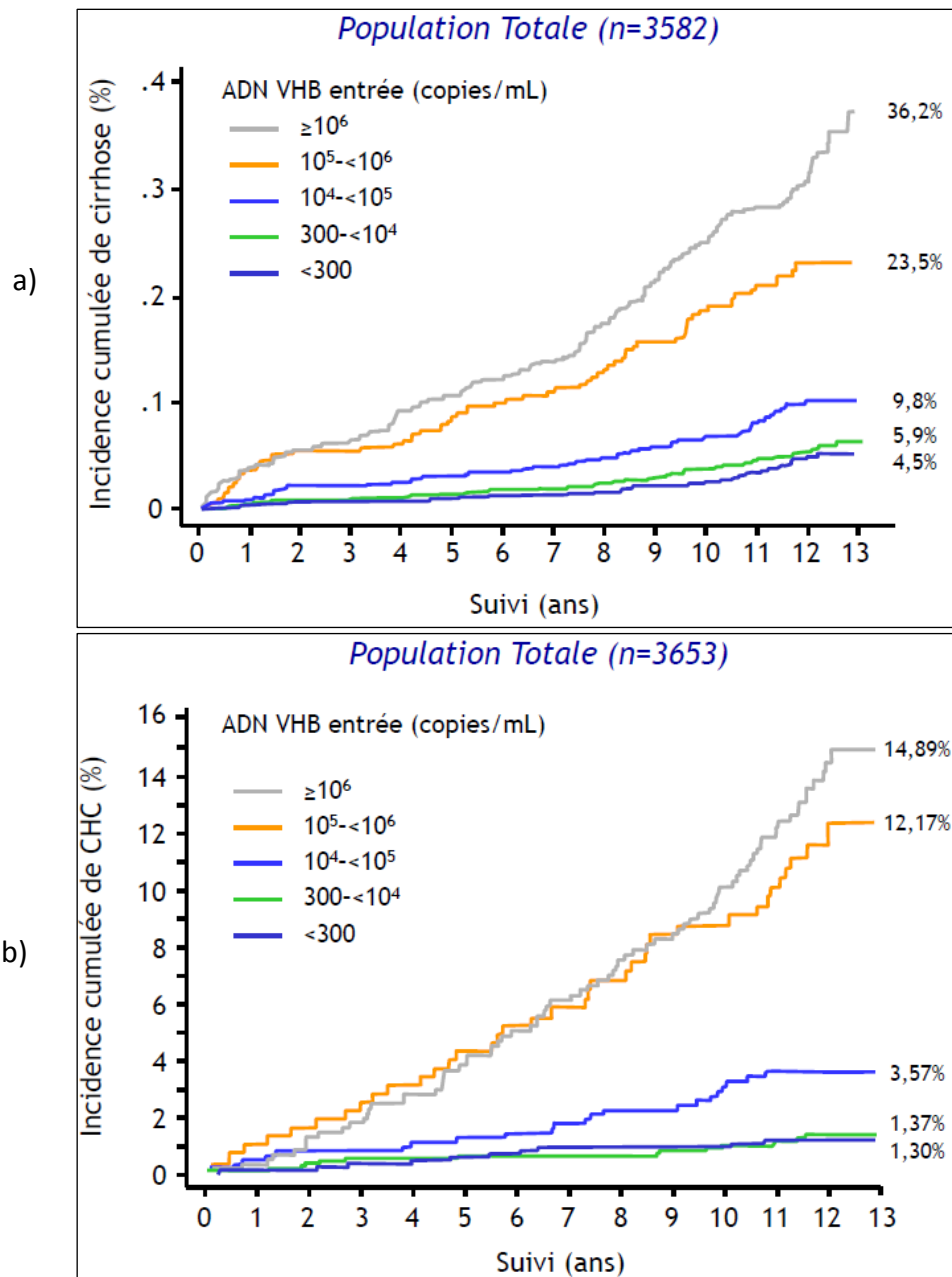
### **6.3.2 Suivi des patients non traités**

Chez les sujets infectés par le VHB et non traités, l'activité des transaminases (les ALAT en particulier) est évaluée tous les 3 mois la 1<sup>ère</sup> année puis tous les 6 mois. Les  $\gamma$ GT ainsi que le taux de prothrombine sont évalués tous les 6 mois. L'AFP est dosée tous les ans et une échographie abdominale est effectuée chaque année. Enfin la charge virale est mesurée tous les ans, de même que la recherche de l'Ag HBe.

### **6.3.3 Charge virale et suivi de l'évolution de l'hépatite B chronique.**

La charge virale correspond à la quantité de molécules virales 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.

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) (**C. J. Chen, et coll., 2006**) Une charge virale élevée prédit également le risque d'apparition de cirrhose. (**U. H. Iloeje, et coll., 2006**) (Figure 13).



**Figure 13: a) Incidence cumulée de cirrhose en fonction de la charge virale ((C Hézode, 2011) Adapté des travaux de Iloeje et coll. (U. H. Iloeje, et coll., 2006))b) Incidence cumulée de CHC en fonction de la charge virale. ((C Hézode, 2011) Adapté des travaux de Chen et coll. (C. J. Chen, et coll., 2006)).** L'incidence cumulée de cirrhose et de CHC est nettement supérieure chez les sujets présentant une charge virale de base supérieure à  $10^6$  copies/ml par rapport à ceux pour qui la charge virale est plus faible.

Cependant, lorsqu'on évalue les patients Ag HBe négatifs, ayant des charges virales basses (< 2000 UI/ml), les facteurs déterminant le risque de CHC incluent le sexe, l'âge, les niveaux d'ALAT et d'Ag HBs ( $\geq 1000$  UI/ml), mais non les niveaux d'ADN viral **(T. C. Tseng et coll., 2012)**. De même, une étude effectuée sur des patients Asiatiques a montré qu'une virémie faible de façon prolongée, provoquant des dommages hépatiques (comme le reflètent les niveaux d'ALAT supérieurs à 0.5-2 fois la limite supérieure de la normale), est fortement associée au développement de complications chez les patients atteints d'hépatite chronique **(M. F. Yuen et coll., 2005)**.

Il est habituellement admis que les patients ayant une séroconversion HBe présentent des niveaux d'ALAT normaux, une charge virale faible voire indétectable, des anomalies minimales à la biopsie hépatique, et une progression de la maladie avec complication en CHC peu fréquente. Cependant, des études ont montré que la séroconversion HBe n'est pas toujours suivie d'une évolution favorable de la maladie ; une hépatite active peut avoir lieu suite à la séroconversion, provoquant une cirrhose ou un CHC **(Y. S. Hsu et coll., 2002)**. Cette étude démontra également que 87 % des patients négatifs pour l'Ag HBe, présentaient une mutation au niveau du nucléotide 1896 de la région pré-core (mutant pré-core). L'infection par ces mutants est caractérisée par une sérologie négative pour l'Ag HBe, des niveaux élevés de charge virale (supérieurs à  $10^5$  copies/ml) et des augmentations persistantes ou intermittentes des niveaux d'ALAT. Ces résultats suggèrent alors qu'un résultat de sérologie, négatif pour l'Ag HBe n'est pas suffisant ; une mesure complémentaire de la charge virale est indispensable pour un meilleur suivi de l'évolution de l'infection.

D'autre part, une corrélation a 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 prédictif de la séroconversion HBe **(C. J. Liu, et coll., 2006, T. Yamaura et coll., 2003)**; c'est le cas de l'étude cas-contrôle réalisée au Japon par Yamaura et ses collègues qui ont noté que la charge virale des patients infectés chroniquement par le VHB commençait à diminuer dans les trois années précédant la séroconversion, alors que cette diminution n'était pas observée chez les sujets ne présentant pas de séroconversion. **(T. Yamaura, et coll., 2003)**

La détection de l'ADN viral est également importante dans le cadre des hépatites occultes, définies par une sérologie négative pour l'Ag HBs avec un niveau bas ou indétectable de charge virale. Dans ces cas, les taux sériques d'ADN du VHB sont inférieurs à  $10^3$  copies/ml,

et les taux hépatiques d'ADN viral sont également bas chez les patients Ag HBs négatifs présentant une hépatite chronique avec cirrhose. Cette situation particulière montre l'importance de la présence de techniques sensibles pour la quantification de très bas niveaux d'ADN viral. **(C. Brechot et coll., 2001)**

Enfin, certaines techniques immuno-enzymatiques actuellement commercialisées peuvent être mises en défaut pour la détection de l'Ag HBs des mutants « s », car le déterminant antigénique « s » a été modifié suite à une pression immunitaire naturelle ou induite par la vaccination ou la thérapie. (Rapport Afssaps 2009). Le recours aux techniques moléculaires pour la quantification de la charge virale s'avère alors nécessaire.

## **7 Traitement de l'hépatite B chronique**

### **7.1 Le but du traitement**

L'objectif du traitement pour les patients atteints d'hépatite B chronique est de limiter le plus possible la réplication virale afin de prévenir la progression de la maladie vers la cirrhose, la décompensation hépatique, le CHC et éventuellement la mort.

Cependant, l'éradication complète de l'infection chronique est difficile à cause de l'intégration de l'ADN viral dans le noyau de l'hépatocyte sous forme d'ADNccc, appelé encore ADN superenroulé. Cet ADN superenroulé a une demi-vie extrêmement longue et se maintiendrait dans la cellule infectée ce qui pourrait expliquer la réactivation du virus et favoriserait l'oncogénèse et le développement de CHC **(EASL, 2012)**.

### **7.2 Les indications pour le traitement**

Selon les directives de l'EASL (European Association for the Study of the Liver), les patients pour lesquels le traitement est généralement indiqué sont ceux qui présentent une charge virale supérieure à 2000 UI/ml, et/ou des niveaux sériques d'ALAT au-dessus de la limite supérieure de la normale, une maladie du foie suffisamment sévère c'est-à-dire une biopsie du foie montrant des lésions modérées à sévères de nécrose et d'inflammation et/ou au moins une fibrose modérée (Tableau III). Pour les patients qui remplissent les critères cités pour l'ADN viral et l'histologie du foie, le traitement devrait être mis en place même si les niveaux d'ALAT sont normaux. Les indications pour le traitement devraient également

prendre en compte l'âge du malade, son état de santé, et les antécédents familiaux de CHC ou de cirrhose, et les manifestations extrahépatiques (**EASL, 2012**).

**Tableau III: Directives de l'EASL pour le traitement de l'hépatite B chronique**

(Adapté de Graham S Cooke, [http://www.iapac.org/icvh/presentations/ICVH2013\\_Plenary2\\_Cooke.pdf](http://www.iapac.org/icvh/presentations/ICVH2013_Plenary2_Cooke.pdf) consulté le 20/05/2013)

HBV DNA (UI/ml)	ALT (UI/ml)	Fibrose du foie		Traitement ?
		Fibroscan	Biopsie	
>2000	>40	>5	F >1	<b>Traiter</b>
DéTECTABLE		>10	F >3	<b>Traiter</b>
<2000	<40	≤5	F ≤1	Observer
>2000	<40	>5	F >1	<b>Traiter</b>
<2000	>80	>5	F >1	<b>Traiter</b>

### 7.3 Les stratégies thérapeutiques

Actuellement, il existe 2 différentes stratégies thérapeutiques applicables à la fois chez les malades atteints d'hépatite B chronique antigène HBe positif et HBe négatif.

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.

#### IFN/ PEG-IFN

L'interféron est une cytokine synthétisée au cours de l'infection virale. Leur action repose principalement sur l'inhibition de la réplication virale, l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et de cellules NK, et l'augmentation de l'expression de HLA I à la surface des cellules infectées (ce qui facilite la reconnaissance des hépatocytes infectés).

Le PEG-IFN a remplacé l'IFN standard dans le traitement de l'hépatite B chronique principalement en raison de son utilisation plus facile (le produit est administré une fois par semaine).



Les principaux avantages théoriques de l'interféron alpha (conventionnel ou pégylé) sont l'absence de résistance, le potentiel immunitaire de contenir l'infection par le VHB avec la possibilité d'obtenir une réponse virologique prolongée après le traitement et une chance de perte de l'Ag HBs chez les patients qui obtiennent et maintiennent des niveaux indétectables de charge virale. Cependant, de fréquents effets secondaires et l'administration par injection sous-cutanée sont les principaux inconvénients du traitement par interféron alpha. De plus, l'interféron alpha est contre-indiqué chez les malades souffrant de cirrhose post-virale B décompensée, de maladie auto-immune, en cas de dépression ou de psychose sévère ainsi que chez les femmes en état de grossesse.

Pour les patients atteints d'hépatite B chronique AgHBe positif, les facteurs préthérapeutiques prédictifs de la séroconversion HBe sont : une charge virale basse (inférieure à  $10^7$  UI/ml), des niveaux élevés d'ALAT sérique (au-delà de 2-5 fois la limite supérieure de la normale), le génotype du VHB( il a été démontré que les génotypes A et B étaient associés à un taux plus élevé de séroconversion HBe et HBs que les génotypes D et C après le traitement avec le (PEG-)IFN )et un score élevé d'activité à la biopsie hépatique(au moins A2 dans le score Metavir). Concernant les sujets AgHBe négatif, il n'y a pas de facteurs prédictifs de la réponse au traitement (**EASL, 2012**).

#### Les analogues nucléos(t)idiques

Les principaux analogues nucléosidiques sont la lamivudine, l'entécavir, la telbivudine) et les analogues nucléotidiques : l'adéfovir et le ténofovir.

L'Entécavir et le ténofovir sont de puissants inhibiteurs de la réplication du VHB et ont une haute barrière de résistance. Ainsi, ils peuvent être utilisés avec confiance en monothérapie de première ligne. La lamivudine, la telbivudine et l'adéfovir peuvent être utilisés pour le traitement de l'hépatite B chronique dans le cas où les deux premières molécules ne sont pas disponibles ou non appropriées.

La Lamivudine est un agent peu coûteux, mais engendre des taux très élevés de résistance en monothérapie à long terme. L'adéfovir est moins efficace et plus coûteux que le ténofovir, et engendre des taux de résistance plus élevés.

La telbivudine est un puissant inhibiteur de la réplication du VHB, mais, en raison d'une faible barrière génétique de résistance, une forte incidence de résistance a été observée

chez des malades avec un niveau de réplication virale élevé avant le traitement ainsi que chez ceux présentant des niveaux détectables d'ADN viral après 6 mois de traitement (EASL, 2012).

L'incidence de la résistance au traitement au bout de 5 ans par ces différents analogues est représentée dans la figure 14.

Un traitement au long cours par les analogues est nécessaire pour les patients qui ne peuvent obtenir une réponse virologique soutenue sans traitement et qui nécessitent un traitement prolongé ; c'est à dire pour les patients Ag HBe-positifs qui ne développent pas une séroconversion anti-HBe et pour les patients Ag HBe négatifs. Cette stratégie est également recommandée chez les patients atteints de cirrhose, quel que soit leur statut HBe. Toutefois, il est optimal de maintenir la suppression de l'ADN du VHB à un niveau indétectable par PCR en temps réel quel que soit le médicament utilisé.(EASL, 2012)

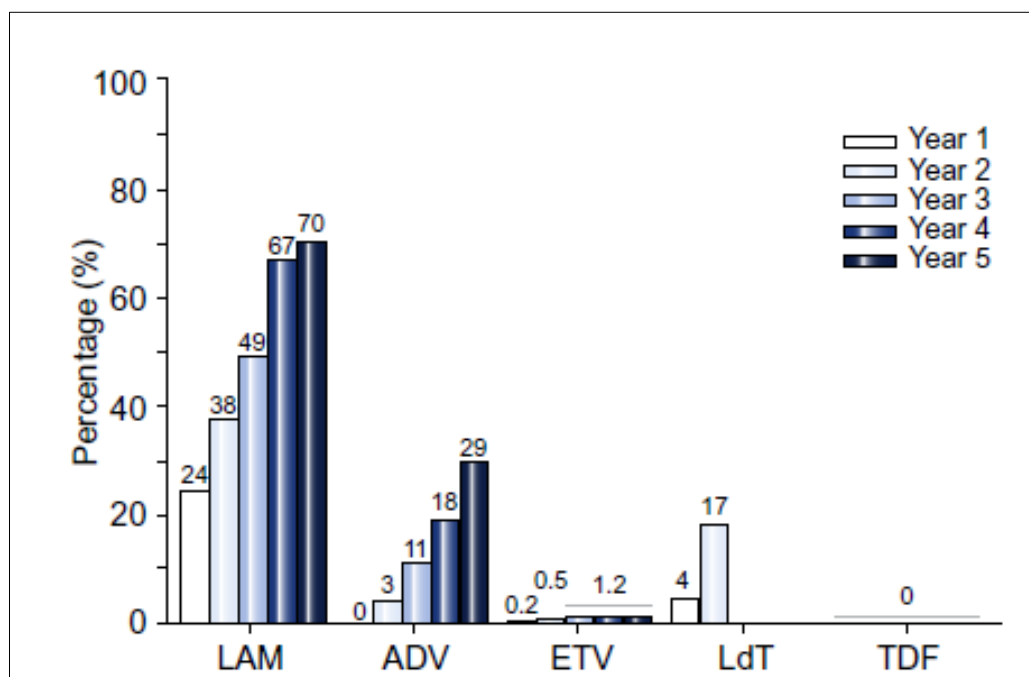


Figure 14: Incidence cumulée de la résistance aux médicaments antiviraux au cours d'essais-pivots chez des patients atteints d'hépatite B chronique, naïfs aux analogues nucléos(t)idiques (EASL, 2012)

## 7.4 Les mutants d'échappement au traitement

Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques peuvent provoquer l'émergence de mutations qui confèrent une résistance au traitement. Ces mutations touchent principalement le gène de la polymérase virale (Figure 15).

La mutation de résistance la plus fréquente concerne la résistance à la lamivudine notée rtM204V/I, touchant le domaine C de la polymérase. Elle transforme le motif YMDD (tyrosine-méthionine-aspartate-aspartate) en YVDD (tyrosine-valine-aspartate-aspartate ou YIDD (tyrosine-isoleucine-aspartate-aspartate) (**G. A. Tipples et coll., 1996**). Cette mutation est souvent accompagnée d'une autre mutation, la rtL180M dans le domaine B de la polymérase et qui peut affecter la réplication virale.

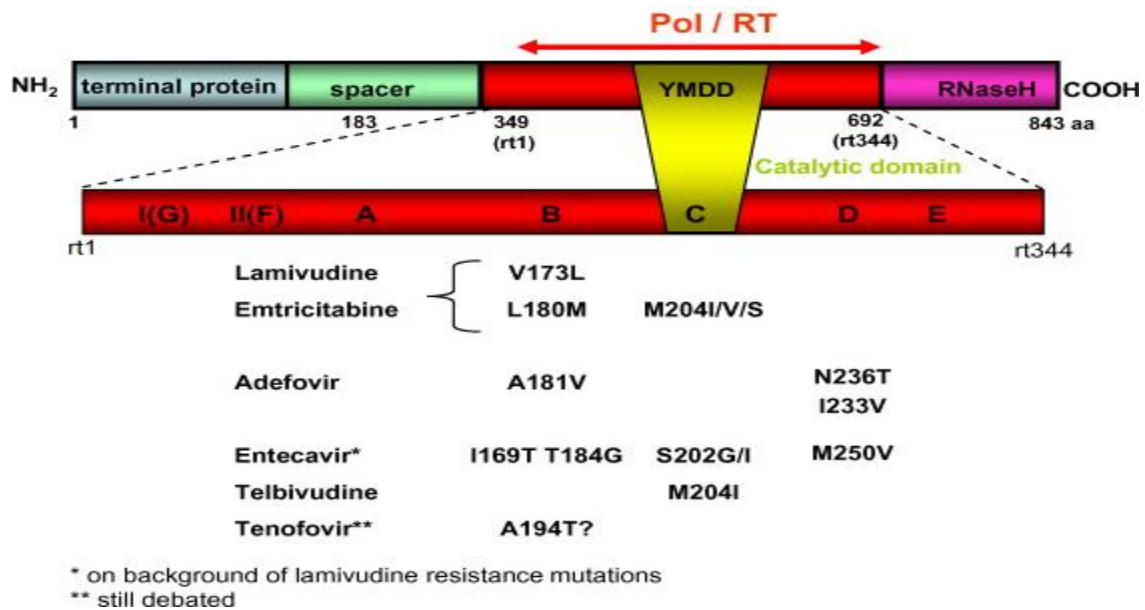
Compte tenu du chevauchement des cadres ouverts de lecture des gènes codant la polymérase virale et l'Ag HBs, les mutations observées sur le gène de la polymérase virale peuvent avoir des répercussions sur la séquence de la protéine d'enveloppe. Ainsi, pour les mutations associées à la résistance à la lamivudine, la mutation rtM204V est associée à un changement sI195M sur l'Ag HBs, alors que la mutation rtM204V est associée à 3 changements possibles, sW196S, sW196L, ou un codon stop (**A. Bartholomeusz et coll., 2006**).

Les principales mutations de résistance à l'adéfovir sont notées N236T et/ou A181V et touchent respectivement les domaines D et B de la polymérase virale.

Les mutations de résistance à l'entécavir ont lieu sur un fond de résistance à la lamivudine car ces patients ont reçu de l'entécavir suite à un échec thérapeutique à la lamivudine.

La résistance à la telbivudine a été observée au cours d'essais de phase II, chez 4.5% des patients, et est associée à la mutation M204I au niveau de la polymérase virale.

Deux cas de résistance au ténofovir ont été identifiés chez des patients co-infectés HBV-HIV, recevant de la lamivudine et du ténofovir. Chez ces patients, la mutation A194T a été trouvée en plus des mutations de résistance à la lamivudine. Mais ceci n'a pas été confirmé par une autre étude. (**A. Kay et coll., 2007**)



**Figure 15: Les mutants de résistance médicamenteuse touchant la polymérase virale**

Les quatre domaines de la polymérase sont ici représentés : Protéine terminale (bleu), SPACER (vert), domaine Polymérase(Rouge) et la RNaseH (rose). Le domaine Pol/RT a été agrandi pour montrer les sous-domaines. Le système de numérotation utilisé pour identifier les mutants de résistance médicamenteuse suit les recommandations de Stuyver et coll. (2001) (A. Kay, et coll., 2007).

## 7.5 Intérêt de la mesure de la charge virale au cours du traitement anti-VHB

Comme vu précédemment, la quantification de l'ADN viral s'est avérée utile pour la prise de décision de la mise en place du traitement antiviral. La mesure de la charge virale est également importante pour prévoir la réponse au traitement et pour déterminer son efficacité.

En effet, Perillo et collaborateurs, au cours d'un essai randomisé portant sur le traitement par l'IFN-alpha avec ou sans prednisone, affirmèrent que le taux sérique d'ADN viral avant le début du traitement était le plus important prédicteur de la réponse au traitement. En effet, ils trouvèrent qu'environ 50% des patients présentant une charge virale de base inférieure à 100 pg/ml ( soit  $2,8 \cdot 10^7$  copies/ml) répondaient mieux au traitement par 5 MUI d'IFN alpha, alors que seulement 7% des patients présentant une charge virale de base supérieure à 200 pg/ml( soit  $5,6 \cdot 10^7$ ) répondaient à ce même traitement.(**R. P. Perrillo, et coll., 1990**)

Une étude réalisée en 2004 par Eijk et coll. aux Pays-Bas, approuve qu'une quantification de l'ADN du VHB pouvait être utilisée pour une identification précoce d'une non-réponse à

l'IFN-alpha et qu'une surveillance du patient par cette mesure était meilleure que sa surveillance par une quantification de l'Ag HBe. Alors, un test de quantification réalisé à 12 semaines de traitement pourrait être utilisé comme un outil de suivi permettant une décision sur la poursuite du traitement ou sur son ajustement. De plus cette étude montre qu'une mesure de la charge virale avant le début du traitement, associée à une baisse de la charge virale entre cette première mesure et celle réalisée à la 12<sup>e</sup> semaine avaient une haute valeur prédictive pour l'identification des patients ayant peu de chance de parvenir à une réponse thérapeutique avec l'IFN-alpha. **(A. A. van der Eijk, et coll., 2006)**

De plus, la surveillance des niveaux d'ADN viral est indispensable pour évaluer la réponse initiale au traitement antiviral, et pour déterminer si cette réponse est maintenue au cours du traitement. Cette surveillance permettra alors de prédire une rémission de la maladie hépatique, ou l'apparition d'une résistance médicamenteuse.

L'EASL a ainsi défini les différents types de réponses virologiques en fonction des variations de la charge virale au cours du traitement par des analogues nucléos(t)idiques **(EASL, 2012)**. Tout d'abord, une absence de réponse a été définie comme une baisse de la charge virale inférieure à 1 log 10 UI/ml entre la mesure de base et le 3<sup>e</sup> mois de traitement.

Concernant la réponse virologique, elle est définie par un niveau indétectable d'ADN viral par une technique sensible de PCR. Cette quantification est généralement faite tous les 3 à 6 mois durant le traitement.

Une réponse virologique partielle correspond à une diminution de plus de 1 log 10 UI/ml de la charge virale, mais suivie d'une charge virale détectable après au moins 6 mois de traitement conforme.

Un échappement virologique peut également être observé ; il est défini par une augmentation confirmée de plus de 1 log 10 UI/ml de la charge virale par rapport au nadir (plus petite mesure observée au cours du traitement). Cet échappement virologique peut être précédé par une augmentation des transaminases.

L'échappement virologique est principalement dû à une résistance médicamenteuse par apparition de mutants de résistance. Cette résistance est caractérisée par une sélection de mutants du HBV présentant des substitutions dans leurs acides aminés, leur conférant une susceptibilité réduite aux analogues nucléotidiques administrés.

Prenant l'exemple de la Lamivudine, une étude démontra que les patients ayant une charge virale supérieure à 1000 copies/ml après 6 mois de traitement avaient 63.2% de risque de développer par la suite des mutants YMDD. **(M. F. Yuen, et coll., 2001)**

Ces mutations conférant une résistance peuvent être confirmées par un test de génotypage.

## 8 Prévention de l'hépatite B

Le meilleur moyen de prévenir l'hépatite B et ses complications est l'immunisation active par la vaccination. Le premier vaccin contre l'hépatite B a été mis au point par le français Philippe Maupas (Centre hospitalier de Tours, France) avec une équipe sénégalaise. **(P. Maupas et coll., 1976)** De plus, cette équipe franco-sénégalaise a démontré l'efficacité du vaccin suite à une étude réalisée sur des enfants de moins de 2 ans au Sénégal, vaccinés par 3 doses du vaccin à un mois d'intervalle **(P. Maupas et coll., 1981)**. Ainsi les vaccins contre l'hépatite B sont disponibles depuis 1982 et il a été prouvé que ces vaccins sont sûrs, hautement immunogènes et efficaces dans la prévention de l'hépatite aiguë et chronique.

Le vaccin contre l'hépatite B est constitué d'Ag HBs. Deux types de vaccins sont disponibles : le plus ancien (1981-1982) est préparé à partir d'Ag HBs purifié à partir de plasma de porteurs chroniques. Ces particules virales étant inactivées par une combinaison d'urée, de pepsine, de formaldéhyde, et de chaleur. Au milieu des années 80, un vaccin de « deuxième génération » a été commercialisé, obtenu par recombinaison génétique. C'est une protéine recombinante obtenue par insertion du gène du VHB codant l'Ag HBs, dans des cellules de levures de bière (cas du vaccin Engerix B®) ou dans des cellules ovariennes du hamster chinois (vaccin Genhevac B Pasteur®).

Ces vaccins sont aujourd'hui disponibles sous forme monovalente, mais aussi sous forme de combinaisons, tel que le vaccin hexavalent Infanrix Hexa® qui est un vaccin combiné diphtérique, tétanique, coquelucheux acellulaire, poliomyélitique, *Haemophilus influenzae b*, hépatite B.

Les vaccins sont administrés par voie intramusculaire, dans la cuisse chez les nourrissons et dans le muscle deltoïde chez les adultes et les enfants. Les vaccins contre l'hépatite B sont administrés selon un schéma classique de trois doses (de type 0-1-6 mois), mais ce schéma peut varier selon les pays. Ces trois doses produisent une réponse immunitaire avec des

titres d'anticorps considérés comme protecteurs (supérieurs à 10mUI/ml) chez plus de 95 % des nourrissons sains, des enfants et des adolescents et chez plus de 90% des adultes sains. **(E. Leuridan et coll., 2011).**

La vaccination contre le VHB permet l'acquisition d'une mémoire immunitaire solide assurant une protection immunitaire efficace, spécifique contre l'Ag HBs, et qui persiste malgré une diminution du titre des anticorps anti-HBs sous le seuil de 10 mUI/ml. **(E. Leuridan, et coll., 2011, D. J. West et coll., 1996).**

Afin d'éliminer l'infection par le VHB, même dans les régions de faible endémie, une immunisation universelle est indispensable. C'est dans cette visée qu'en 1992, l'OMS a recommandé l'introduction du vaccin contre l'hépatite B, dans tous les programmes nationaux de vaccination, pour les nourrissons et adolescents, avant décembre 1997. **(D. Lavanchy, 2008)**

En 2011, 179 pays avaient inclus la vaccination contre l'hépatite B des nourrissons dans leurs programmes nationaux de vaccination.

**([http://www.who.int/immunization\\_monitoring/data/SlidesGlobalImmunization.pdf](http://www.who.int/immunization_monitoring/data/SlidesGlobalImmunization.pdf)).**

Au Sénégal, le vaccin contre l'hépatite B a été introduit en 2005 dans le Programme Elargi de Vaccination. Le schéma classique est une vaccination à la 6<sup>e</sup>, 10<sup>e</sup> et 14<sup>e</sup> semaine administré sous forme de vaccin pentavalent (Poliomyélite, diphtérie, tétanos, coqueluche et hépatite B).

A côté de l'immunisation active, une immunisation passive par des immunoglobulines anti-hépatite B (HBIG), préparées à partir de pool de plasma contenant des niveaux élevés d'anticorps anti-HBs, est également possible pour la prévention de l'infection après une exposition au virus. Elle permet une protection temporaire de 3 à 6 mois. Les HBIG doivent être administrées dans les 48 heures suivant l'exposition. Le vaccin contre l'hépatite B doit également être administré dans les 48 heures, sur un site d'injection différent.

De plus, ces immunoglobulines sont utilisées pour l'immunisation des nouveau-nés de mère porteuse chronique de l'antigène HBs. Cette immunisation doit être systématique chaque fois que la recherche, obligatoire de l'AgHBs chez la mère au sixième mois de grossesse, a été positive, ou que le résultat de l'examen n'est pas connu à l'accouchement. Ces nouveau-nés doivent être vaccinés dans les 12 heures suivant la naissance. **(D. Lavanchy, 2008)**

## **CHAPITRE II : VALIDATION DE METHODE SELON LES NORMES DU COFRAC**

Le comité français d'accréditation (COFRAC) émet un certain nombre de recommandations pour la validation des méthodes quantitatives (Portée flexible de type B). (<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>). Les paramètres analytiques recommandés sont les suivants :

### **1 Spécificité analytique**

Elle est définie selon la norme ISO 18113 comme la capacité d'un système de mesure, utilisant une procédure de mesure spécifiée, à produire des résultats de mesure, pour un ou plusieurs mesurandes, qui ne dépendent ni les uns des autres.

### **2 Fidélité**

Selon la loi ISO 3534-1, la fidélité est l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées. Elle peut être étudiée par la répétabilité et par la reproductibilité intra-laboratoire.

#### **2.1 Répétabilité**

La répétabilité est la fidélité sous des conditions de répétabilité : l'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage, dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour le paramètre concerné.

En pratique, Il est recommandé d'utiliser au minimum 2 niveaux de concentration avec si possible un niveau proche de la zone décisionnelle. Le nombre de détermination dépend de la cadence de l'analyseur à valider, du coût des réactifs, ...

L'effectif idéal est de 30 pour une interprétation statistique optimale. Un nombre d'essais inférieur devra être argumenté en fonction de critères pertinents (coûts des analyses, durée



d'analyse, ...). La valeur statistique des résultats obtenus sera d'autant plus réduite que ces effectifs seront faibles.

## 2.2 Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs: l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages...

Classiquement, l'essai de fidélité intermédiaire est généralement réalisé à partir de Contrôle Interne de Qualité (CIQ). La fidélité intermédiaire est établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et à deux niveaux minimum.

L'exploitation des résultats de répétabilité et de reproductibilité consiste à calculer la moyenne ( $m$ ), l'écart-type ( $s$ ) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

$$\text{CV en \%} = (s/m) \times 100$$

## 3 Justesse

La justesse se définit comme l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée. La justesse, quantifiée par le biais, est estimée en comparant la moyenne obtenue ( $m$ ) lors de l'étude de fidélité intermédiaire (**reproductibilité** intra-laboratoire), établie sur des échantillons de contrôle de qualité externes, à la valeur cible attendue, assimilée à la valeur "vraie" ( $v$ ) de l'échantillon testé. Elle est exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

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

Plus le biais est faible, et plus le résultat obtenu est proche de la valeur vraie.

## 4 Incertitude

L'incertitude de mesure associée à un résultat est la combinaison d'un certain nombre de composantes ayant une ou des influence(s) sur la valeur trouvée pour un mesurande donné. Il est important avant toute démarche d'évaluation de l'incertitude d'analyser le processus de mesure de façon à identifier « le plus exhaustivement possible » les facteurs d'incertitude.

## 5 Contamination

Des phénomènes de contamination peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques. Le test de contamination inter-échantillons sert donc à s'assurer qu'un échantillon de forte concentration ne viendra pas surestimer les résultats obtenus si l'échantillon suivant est de faible concentration. L'étude de la contamination inter-échantillons est effectuée de la façon suivante : un échantillon de valeur élevée (ou positif fort) est analysé 3 fois consécutivement (H1, H2, H3, de moyenne mH) suivi d'un échantillon à valeur basse également analysé 3 fois (B1, B2, B3). Les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) sont répétées 5 fois afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3).

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

## 6 Intervalle de mesure

Il s'agit de déterminer la limite de détection et la limite de quantification de la méthode.

### 6.1 Limite de détection

Il s'agit du plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions. C'est la quantité minimale détectable pour laquelle la réponse (en signal mesuré) peut être distinguée avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction.

Pour estimer la limite de détection, il faut effectuer 30 mesures répétées des blancs (sérum dépourvu de la substance à doser, "calibrateur" zéro, diluant) dans une même série, et on

calcule la moyenne obtenue ( $m_b$ ) et l'écart-type ( $s_b$ ) exprimé en concentration de ces 30 mesures. La limite de détection peut être calculée selon la formule suivante :

$$\text{Limite de détection} = 3 \times s_b$$

## 6.2 Limite de quantification

La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, rendue avec un niveau de confiance acceptable et d'incertitude connue.

La limite de quantification peut aussi être calculée selon la formule suivante :

$$\text{Limite de quantification} = 10 \times s_b$$

## 7 Stabilité des réactifs

Elle consiste à évaluer la stabilité des réactifs "sensibles". Il s'agit d'analyser un étalon de niveau de concentration élevée en tant qu'échantillon inconnu à intervalle régulier entre  $J_1$  et  $J_n$  (avec  $n = 10$  au minimum). Des limites de stabilité théoriques ( $Lst$ ) en % du taux théorique de l'étalon utilisé sont alors établies. Pour cela, un graphe est tracé avec en abscisses les jours et en ordonnée le % de variation.

Vérifier que chaque mesure de l'étalon  $v$  est comprise dans l'intervalle  $[v - Lst\%; v + Lst\%]$ .

La limite de durée de stabilité correspond à la dernière valeur de l'étalon comprise dans l'intervalle  $[v - Lst\%; v + Lst\%]$ .

## 8 Robustesse

La « robustesse » d'une technique d'analyse est la mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode.

Moins ces paramètres ont d'influence sur l'analyse et plus la méthode est dite robuste.

## **9 Comparaison avec une technique de référence**

Pour comparer les résultats d'une méthode Y (à tester) avec ceux d'une méthode X (utilisée au laboratoire ou prise comme référence), au moins 30 échantillons de patients sont analysés, couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré.

Ces échantillons, frais de préférence, sont analysés en simple par les 2 techniques, dans un délai le plus court possible.

# **DEUXIEME PARTIE :** **Travail Expérimental**

# **CHAPITRE I : JUSTIFICATIF, OBJECTIFS ET CADRE DE L'ETUDE, ET L'ECHANTILLONNAGE**

## **1 Justificatif de l'étude**

Le Sénégal constitue une zone de forte endémicité pour l'hépatite B avec 11% de porteurs chroniques du virus et 85 % de la population générale présentant au moins un marqueur viral (**PNLH, 2012 ; Ministère de la santé, 2012**). 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 traitement antiviral s'impose : il permet de bloquer la réplication virale et de contrôler l'évolution de la maladie.

L'indication du traitement antiviral chez les patients présentant une hépatite chronique repose, selon les recommandations de l'EASL, sur la combinaison de 3 critères majeurs : le niveau sérique d'ADN viral, les niveaux sériques de transaminases, et l'histologie du foie.

La surveillance de la charge virale est également indispensable au début du traitement (après 8 -12 semaines) pour évaluer la réponse primaire, puis à long terme tous les 3 ou 6 mois pour évaluer l'efficacité du traitement et détecter l'apparition probable de résistance médicamenteuse. (**EASL, 2012**)

Ainsi des techniques moléculaires sensibles pour la mesure de la charge virale sont nécessaires pour le suivi des malades sous traitement. Or, ces techniques sont coûteuses et, au Sénégal, la plupart des examens de charge virale pour le VHB sont sous-traités à l'étranger. Ainsi, la non-accessibilité de ces examens pour la majeure partie de la population Sénégalaise infectée reste un obstacle pour leur prise en charge efficace. Il s'avérait donc indispensable de mettre en place une technique de moindre coût pour la mesure de la charge virale du VHB.

## **2 Objectifs de l'étude**

### **2.1 Objectif général**

L'objectif de notre étude est de mettre en place et d'évaluer les performances d'une technique maison de charge virale pour le VHB, par PCR en temps réel.

## **2.2 Objectifs spécifiques**

- Analyser les performances de la technique m2000 Abbott Real Time pour la mesure de la charge virale VHB au sein de l'unité de Biologie moléculaire du laboratoire de Bactériologie-Virologie (Hôpital Aristide le Dantec) par comparaison avec la technique COBAS Taqman (Roche).
- Evaluer les performances de la technique maison, par l'étude de la répétabilité, reproductibilité, et de la contamination inter-échantillons.
- Comparer les valeurs de charge virale obtenues par la technique maison avec celles de la technique commerciale m2000 Abbott Real Time.
- Evaluer la durée de l'analyse et le coût de la technique maison, et les comparer à ceux de la technique m2000 et de la technique Taqman

## **3 Cadre de l'étude**

### **3.1 Les sites de prélèvement des échantillons**

Les prélèvements sanguins utilisés dans notre étude proviennent de 5 sites différents :

- L'Hôpital Régional de Thiès
- L'Hôpital Bartimée (Thiès)
- L'Hôpital Saint Jean de Dieu (Thiès)
- L'unité de Biologie moléculaire du laboratoire de Bactériologie-Virologie du centre hospitalier et universitaire (CHU) Aristide le Dantec (LBV-HALD) à Dakar (Sénégal).

Les prélèvements effectués sur ces sites entrent dans le cadre du projet PROLIFICA (Prevention of liver fibrosis and cancer).

- Le Laboratoire d'analyses de biologie médicale BIO-24 de Dakar.

### **3.2 Le site de traitement des échantillons**

Le site de traitement des échantillons est l'unité de Biologie moléculaire du LBV-HALD.

Ce laboratoire, service hospitalo-universitaire a pour vocation le diagnostic biologique des infections bactériennes et virales, la recherche et la formation dans le domaine de la bactériologie et de la virologie. C'est le centre national de référence des infections

sexuellement transmissibles et un centre collaborateur ONUSIDA. Il est également le siège du réseau africain de recherche sur le SIDA (RARS).

## **4 Echantillonnage**

L'étude a été réalisée sur du sérum ou du plasma provenant de sujets infectés par le VHB, testés positifs pour l'Ag HBs. Une partie de ces échantillons de plasma/sérum provient du Laboratoire BIO-24 d'analyses de biologie médicale, et l'autre partie provient de sujets pré-inclus au projet PROLIFICA. L'un des objectifs de ce projet est de dépister, traiter (Ténofovir) et d'assurer le suivi (clinique et biologique des patients infectés par le VHB.

## **CHAPITRE II : METHODOLOGIE.**

### **1 Vérification des performances du m2000 par comparaison avec la technique Taqman**

Pour mieux évaluer les performances de la technique maison de mesure de charge virale VHB, une comparaison avec une technique commerciale, m2000 Abbott Real Time, a été réalisée. Notre choix s'est porté sur cette technique commerciale du fait qu'elle soit validée et largement utilisée pour la quantification de l'ADN du VHB, ainsi que pour la disponibilité des automates au LBV-HALD-Unité Biologie Moléculaire. Toutefois, les performances de cette technique ont été vérifiées par comparaison avec une autre technique commerciale, COBAS® TaqMan® 48 (Roche).

Pour cela, nous avons comparé pour 20 échantillons, les valeurs de charge virale mesurée sur m2000 à celles obtenues par la technique COBAS® TaqMan® 48 fournies par le laboratoire BIO-24 (l'examen de charge virale est sous-traité par les laboratoires Cerba en France).

#### **1.1 Technique m2000 Abbott Real Time**

La technique Abbott Real Time est un test de PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN du VHB dans le plasma ou le sérum d'individus infectés par ce virus.



Le test consiste en une extraction automatique de l'ADN viral par la plateforme m2000 sample preparation (**m2000sp**), suivie d'une étape d'amplification-détection en temps réel de cet ADN avec l'instrument m2000 real time (**m2000rt**).



Figure 16: Plateforme m2000sp (a) et m2000rt (b) et leurs centres de contrôle.

### 1.1.1 Matériel et réactifs spécifiques au m2000

(Annexe 3)

### 1.1.2 Principes biologiques de la technique

L'extraction de l'ADN est entièrement automatisée sur l'appareil m2000sp. Le principe de l'extraction repose sur 4 grandes étapes : la lyse des particules virales, la capture des acides nucléiques sur des microparticules magnétiques, le lavage des acides nucléiques, et enfin l'éluion des acides nucléiques purs qui seront ensuite transférés avec le mélange réactionnel automatiquement préparé dans une plaque optique de 96 puits, prêts pour l'amplification.

Un contrôle interne (CI), non lié à la séquence cible du VHB, est introduit dans chaque échantillon au début de l'étape d'extraction. Cette séquence sera simultanément amplifiée par PCR et sert de contrôle interne pour démontrer que le processus d'extraction s'est correctement déroulé pour chaque échantillon.

La PCR se déroule dans l'appareil m2000rt. La partie ciblée de l'ADN est une région très conservée dans le gène de surface, permettant la détection des génotypes A à H. La

localisation de la région cible au niveau du tiers N-terminal du gène de surface garantit que le test n'est pas biaisé par les mutants YMDD, les mutants de l'Ag HBs ou les mutants de résistance médicamenteuse. Ceci est expliqué par le fait que cette région est essentielle pour l'assemblage et la sécrétion des particules virales, et ne tolère que des modifications de structure mineure (Protocole Abbott Real Time, 2009).

Les séquences d'ADN cibles présentes à chaque cycle sont amplifiées et détectées à l'aide de sondes spécifiques marquées par fluorescence. Ces sondes sont des séquences oligonucléotidiques d'ADN simple-brin de type Taqman, avec un groupement fluorescent (fluorophore) lié de manière covalente à l'extrémité 5', et un groupement désactivé (quencher) lié de manière covalente à l'extrémité 3'.

En l'absence de séquence cible du VHB, la fluorescence de la sonde est inhibée par la proximité du quencher.

En présence de la séquence cible, l'ADN est amplifié par l'ADN polymérase en présence de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs). Après dénaturation de l'ADN, il y a hybridation des amorces et de la sonde à la séquence cible. Enfin, vient l'étape d'élongation au cours de laquelle la sonde fixée est clivée par l'ADN polymérase séparant ainsi le fluorophore du quencher, permettant l'émission de fluorescence et la détection du signal fluorescent. Le cycle d'amplification au cours duquel le signal fluorescent est détecté par m2000rt, est inversement proportionnel au logarithme de la concentration d'ADN viral présent dans l'échantillon d'origine.

Le principe d'action des sondes type Taqman est présenté dans la figure 17.

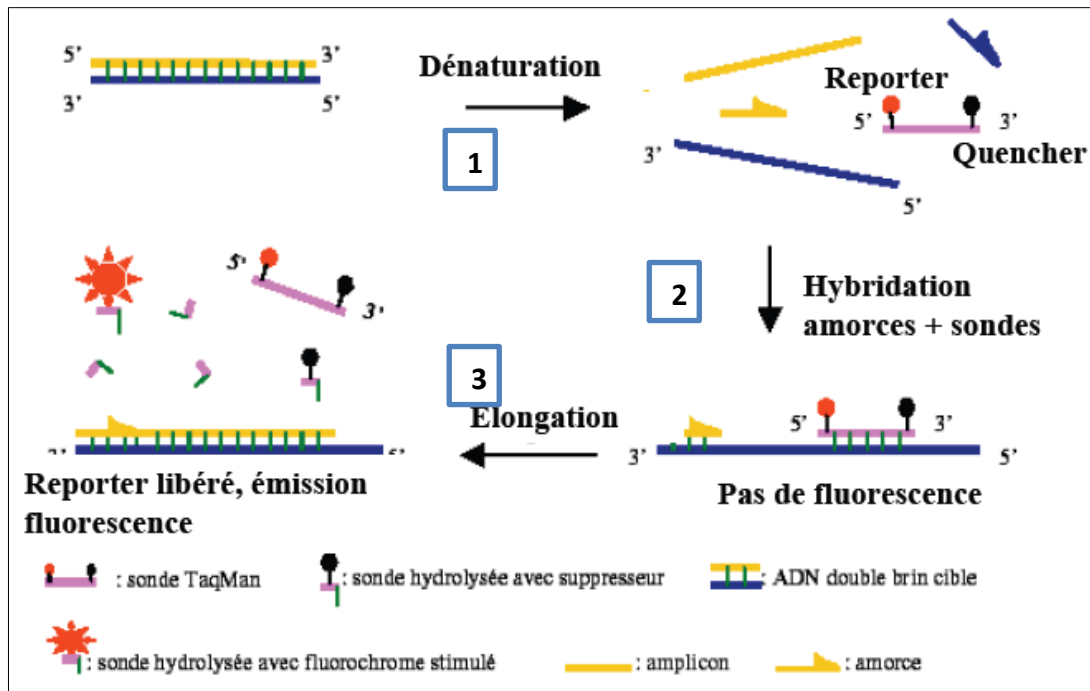


Figure 17: Principe d'action des sondes de type Taqman (E. Poitras, et coll., 2002)

### 1.1.3 Mode opératoire

(Annexe 4)

### 1.1.4 Critères de validité des résultats sur m2000rt

Pour qu'une série soit validée, il faut que les contrôles externes (négatif, faible et fort) soient dans les intervalles de valeurs données par la notice du fabricant. Pour qu'un échantillon soit valide, il faut que le contrôle interne soit amplifié et quantifié dans les intervalles de valeurs données par la notice du fabricant.

### 1.1.5 Performances de la technique

Selon les données du fabricant, la sensibilité de la technique est de 10 UI/ml (34 copies/ml) lorsque le volume de plasma utilisé dans la procédure est de 0.5ml, et elle est de 15 UI/ml (51 copies/ml) lorsque le volume de plasma est de 0.2 ml.

L'intervalle de linéarité de la technique varie de 10 UI/ml à  $10^9$  UI/ml (soit 1 à 9 log UI/ml).

La technique présente une bonne précision avec un écart-type total < 0.25 log UI/ml.

La spécificité du m2000 est de 100% (résultat obtenu en testant 124 sérums séronégatifs pour le VHB ainsi que 125 échantillons de plasma séronégatifs pour le VHB : l'ADN viral n'a été détecté pour aucun des 249 échantillons). (Protocole Abbott Real Time, 2009).

## 1.2 Technique COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, v2.0 (Roche)

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-VHB par l'appareil COBAS® AmpliPrep, couplée à l'amplification et la détection simultanée de l'ADN cible par l'analyseur COBAS Taqman 48. (T. Alice et coll., 2007, S. Hochberger et coll., 2006)

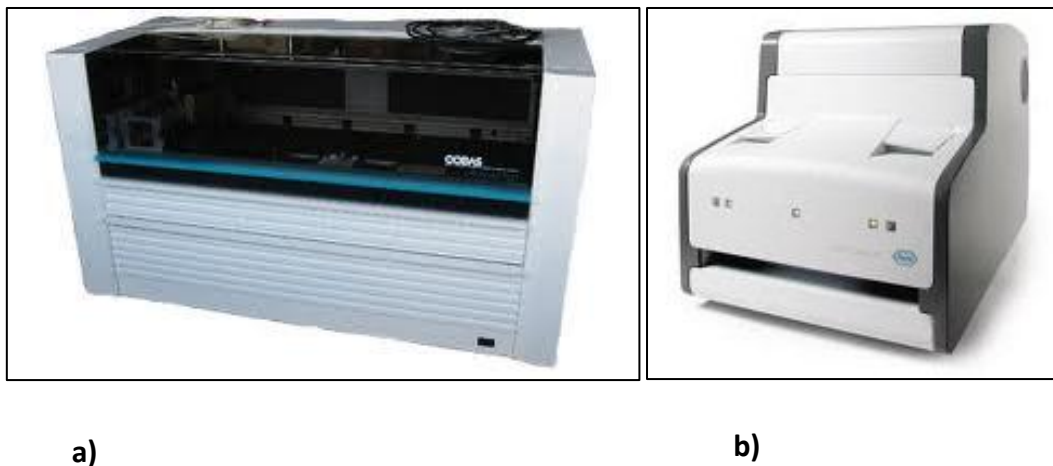


Figure 18: a) Plateforme COBAS® AmpliPrep, b) COBAS Taqman 48

### 1.2.1 Principes biologiques de la procédure

#### 1.2.1.1 Extraction

L'extraction est entièrement automatisée et repose sur la capture de l'ADN viral sur des billes de silice. La procédure utilise 850 µl 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.

### ***1.2.1.2 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 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 (oligonucleotide aptamer), 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 extraits d'ADN-Master Mix est alors transféré dans l'analyseur COBAS® TaqMan® 48.

### ***1.2.1.3 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 et contient des fragments de séquence d'ADN du VHB avec des régions de liaison d'amorce identiques à celles du VHB, mais des sites de liaison de sondes différents de celui 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 conséquence 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 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) (T. Alice, et coll., 2007, S. Hochberger, et coll., 2006).

### **1.2.2 Performances de la technique**

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  $1,1 \cdot 10^8$  UI/ml (1.7 à 8  $\log_{10}$  UI/ml). (T. Alice, et coll., 2007, S. Hochberger, et coll., 2006)

## **2 Evaluation des performances de la technique « maison » de charge virale**

La technique maison de PCR en temps réel évaluée a pour objectif la mesure de la charge virale plasmatique ou sérique du VHB chez les patients atteints d'hépatite B chronique.

### **2.1 Présentation générale de la technique « maison »**

#### **2.1.1 Équipement**

Nous avons utilisé, pour la réalisation de la PCR, le système ABI 73000 combinant un thermocycleur et un module de détection fluorimétrique pilotés par une station de travail allant permettre l'acquisition et le traitement des données obtenues (Figure 19).



**Figure 19: Système Applied Biosyste ABI 7300**

Le système utilise un thermocycleur 96 puits muni d'un module thermoélectrique et d'un couvercle chauffant contribuant à limiter la formation de gradients de température au sein des tubes.

### **2.1.2 Matériel et réactifs de la technique « maison »**

(Annexe 5)

### **2.1.3 Principes biologiques et analytiques de la procédure**

#### **2.1.3.1 Extraction**

L'extraction de l'ADN viral du VHB est réalisée avec le kit QIAamp DNA BLOOD MINI KIT DE QIAGEN qui utilise des colonnes de silice (Figure 20).

La première étape d'extraction consiste à libérer l'ADN du VHB de la capsid virale. Pour cela, les particules virales sont détruites par le tampon de lyse, à température élevée (56°C). Puis la protéinase K digère les protéines liées à l'ADN. Enfin l'éthanol absolu permettra de déshydrater et précipiter l'ADN, facilitant sa fixation sur la membrane de silice.

Après l'extraction, on aura un mélange d'ADN libre et d'autres constituants cellulaires (protéines, lysozymes, organites, débris membranaires etc.)

L'étape suivante consistera donc à séparer l'ADN de ces autres constituants cellulaires, c'est l'étape de purification.

La purification par le kit Qiagen est basée sur le principe des interactions ioniques : l'ADN est adsorbé sur une membrane de silice en présence de sels chaotropiques (qui déshydratent les molécules d'acides nucléiques). Les protéines, les lipides et les polysaccharides ne sont

pas retenus par la membrane. Après lavage de la membrane, les acides nucléiques sont ensuite élués avec de l'eau qualité biologie moléculaire (eau ultrapure) ou avec le tampon d'éluion fourni dans le kit.

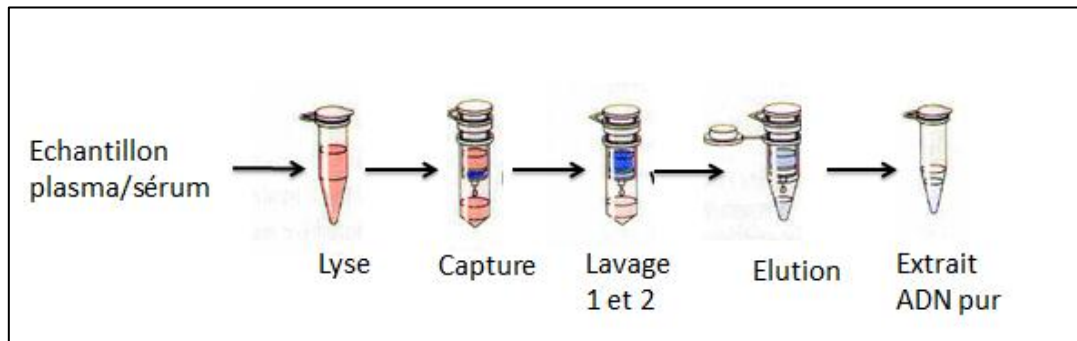


Figure 20: Principe de l'extraction d'ADN par le kit Qiagen

### 2.1.3.2 Amplification-détection

La partie ciblée de l'ADN est une zone de 98 paires de base (pb) du gène de la polymérase virale située aux positions nucléotidiques 1186 à 1283. (Figure 21).

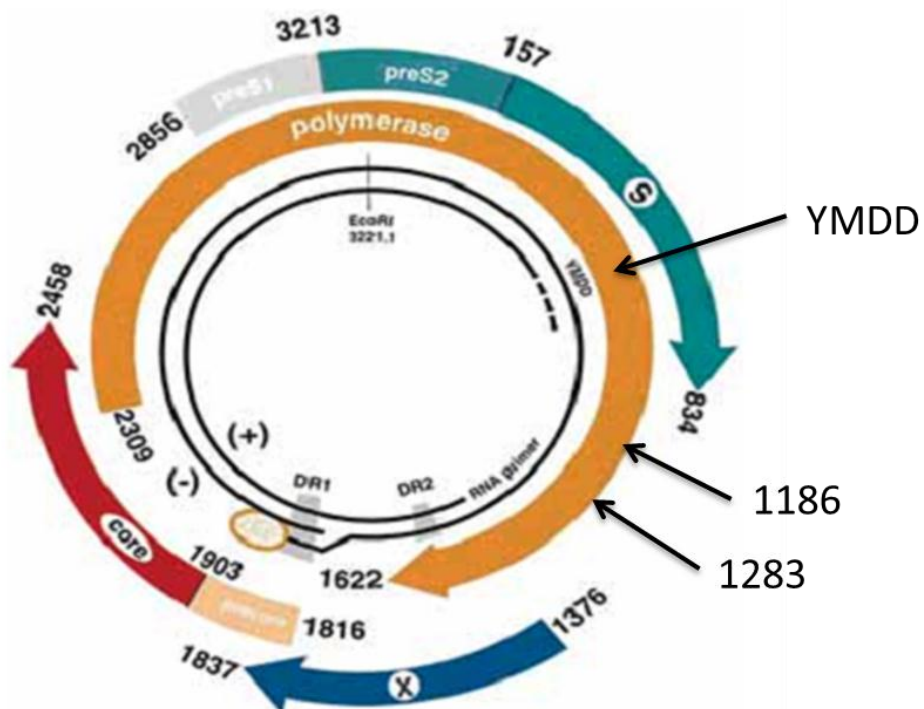


Figure 21: Région ciblée du génome viral (par la technique maison)



Cette localisation de la région cible garantit que le test n'est pas biaisé par les mutants de résistance médicamenteuse, notamment les mutants YMDD de résistance à la lamivudine, localisés au niveau du domaine C de la polymérase virale. De plus, dans cette région ciblée du génome, le gène P ne chevauche ni avec le gène S ni avec les gènes pré-C/C; ce qui assure que les mutants du gène S et les mutants pré-C/C n'ont pas d'impact sur la quantification de l'ADN viral.

En plus des désoxynucléotides triphosphates (dNTPs), du magnésium, de l'ADN polymérase, et du SYBR Green I, le Mix utilisé contient également des dUTP (désoxyuracile triphosphate) et une enzyme, l'uracile DNA glycosylase (UDG). Cette enzyme, en éliminant par hydrolyse les résidus uracile présents avant le début de la réaction PCR, permet de contrôler et prévenir les contaminants apportés par les amplicons de réactions précédentes. Cette enzyme sera inactivée au début de la réaction de PCR en cours.

Après dénaturation de l'ADN, il y a hybridation des amorces sens et anti-sens de part et d'autre de la région considérée, puis extension de ces amorces grâce à l'ADN polymérase. L'amplification est effectuée par la répétition de cycles qui assure une duplication exponentielle de chaque brin.

La détection de l'ADN amplifié se fait grâce au SYBR Green I dont le principe d'action est représenté dans la Figure 22.

Lors de la réaction d'amplification par PCR, le SYBR Green I en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, le SYBR Green I se fixe à l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets. La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de l'étape d'élongation pour chaque cycle se fait par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction PCR.

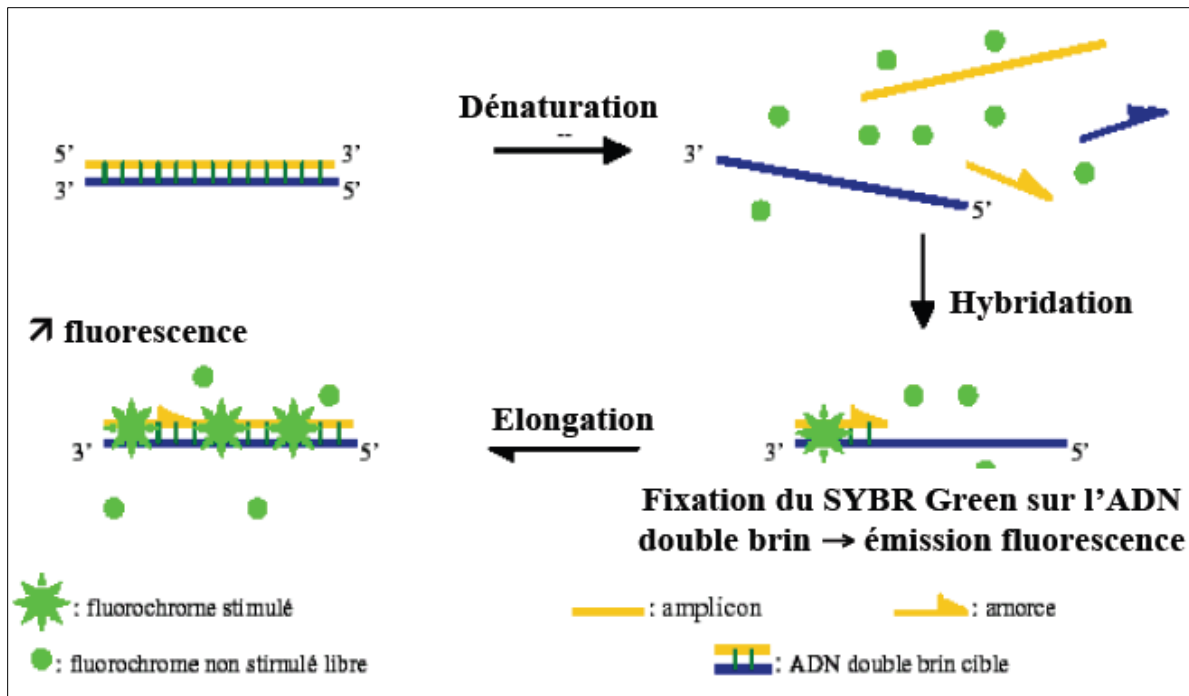


Figure 22: Principe d'action du SYBR Green I.(E. Poitras, et coll., 2002)

L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle au nombre d'amplicons. Le cycle seuil peut être déterminé manuellement ou automatiquement sur le graphe représentant la dérivée de la fluorescence émise en fonction du cycle d'amplification. (Figure 23).

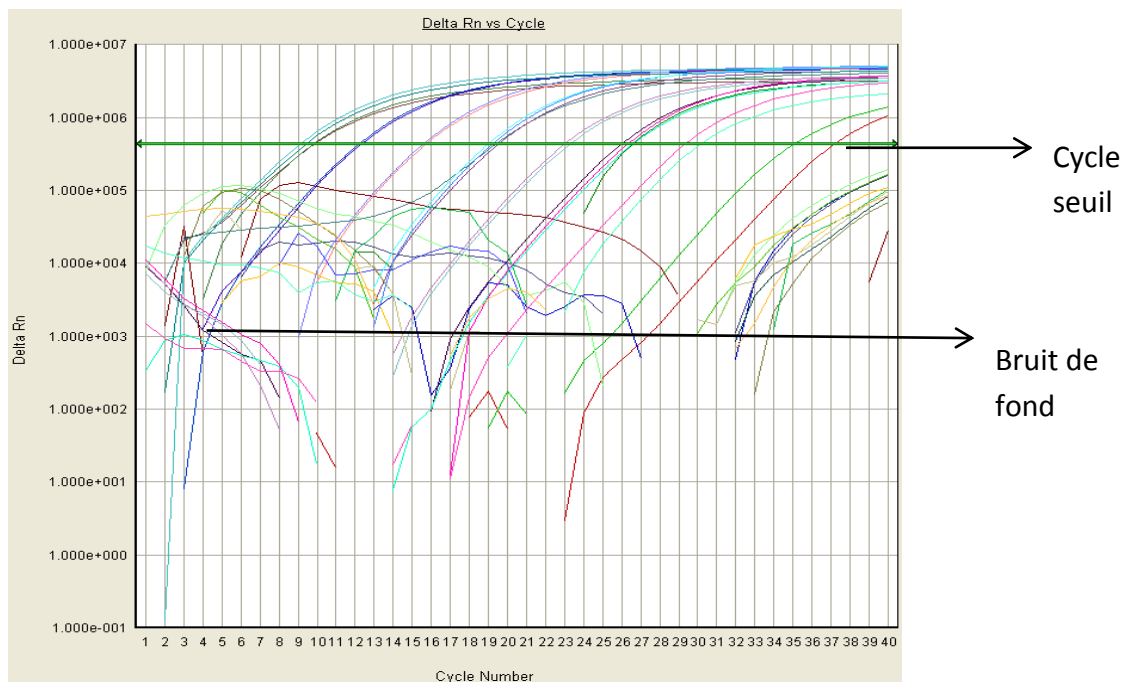


Figure 23: Graphique de la dérivée de la fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification

### ***2.1.3.3 Quantification***

La détermination de la quantité d'acides nucléiques repose sur le principe de la quantification absolue par étalonnage avec un standard. Cette stratégie repose sur l'établissement d'une gamme d'étalonnage à partir de plusieurs dilutions sérielles d'un standard externe constitué par une solution titrée de plasmides contenant la séquence d'intérêt (Annexe 6). Le même couple d'amorces utilisé reconnaît alors la région cible sur l'ADN viral et l'ADN plasmidique.

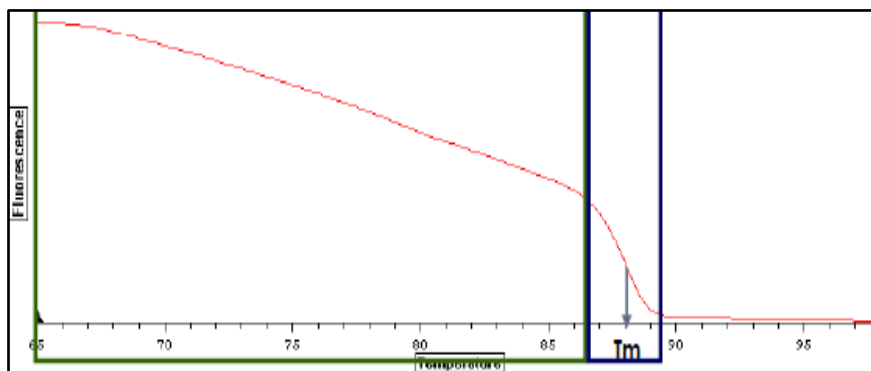
Pour chacune des dilutions effectuées, la cinétique de la réaction PCR est suivie en temps réel afin de déterminer le cycle seuil correspondant. La droite d'étalonnage exprimant les variations du Ct en fonction de la quantité d'acide nucléique cible contenu dans chaque point de gamme est ensuite tracée. Après validation de la droite obtenue, il est alors possible d'en extrapoler le Ct et par conséquent d'en déduire la quantité d'acide nucléique cible initialement présente.

### ***2.1.3.4 Analyse de la spécificité de l'amplification-détection***

La spécificité du système de détection utilisant le SYBR Green I est essentiellement conditionnée par le choix des amorces. Le SYBR Green I marque toutes les molécules d'ADN double brin, qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt. De ce fait, tous les produits de PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorces éventuellement formés vont également engendrer un signal de fluorescence. Ce défaut de spécificité constitue la limite majeure de cette technique. Néanmoins, le système permet de tester la spécificité d'une réaction PCR par l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR (ou courbe de dissociation) et par la détermination de la température de fusion  $T_m$  (melting temperature) des produits amplifiés. Cette courbe est réalisée en soumettant les amplicons à une température progressant de 55°C à 95°C par palier de 0,5°C et en mesurant l'intensité de fluorescence en continu. Ainsi, la courbe de dissociation tracée représente l'émission de fluorescence en fonction de la température. Au fur et à mesure de l'augmentation de la température, les amplicons sont dénaturés, libérant alors le fluorochrome qui n'émet alors

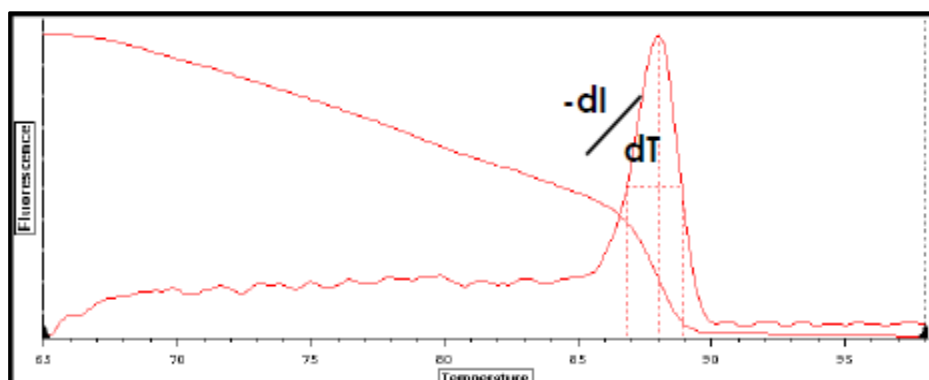
plus de fluorescence, d'où la diminution de la fluorescence. (Figure 24). La  $T_m$  est alors définie comme la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme de double brin, l'autre moitié sous forme de simple brin ; cette température renseigne alors sur la spécificité du produit dissocié en fonction des amorces employées. Généralement, la courbe établie par le système informatique relié au thermocycleur représente la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température. La température de fusion d'un double brin correspond à un pic sur cette courbe (Figure 25).

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion spécifique, et la courbe ainsi obtenue permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié (Figure 26).



**Figure 24: Courbe de la fluorescence en fonction de la température.(P. Lampron)**

$T_m$  correspond au point d'inflexion de cette courbe



**Figure 25: Courbe de dissociation (P. Lampron)**

La courbe de fusion est obtenue en traçant la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température.

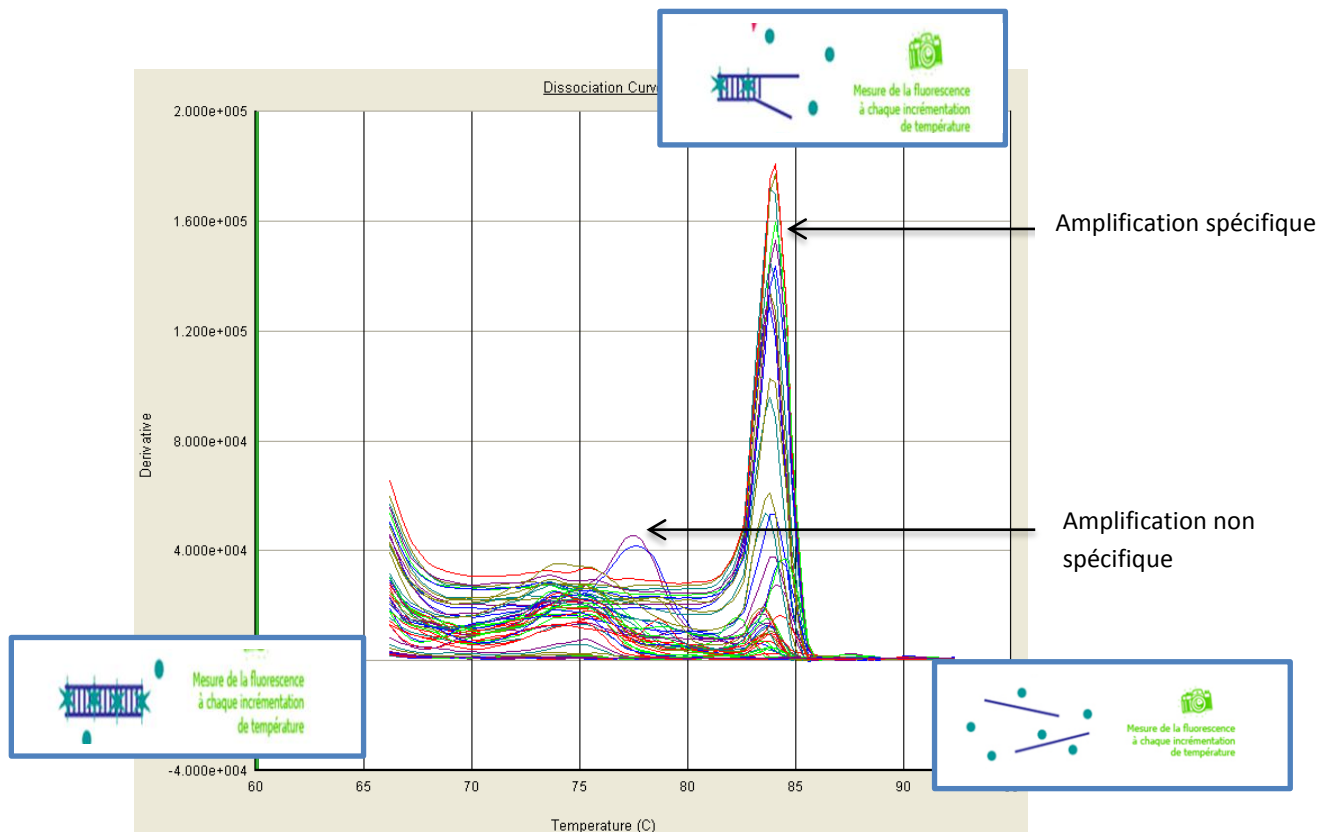


Figure 26: Principe de la courbe de dissociation

## 2.1.4 Mode opératoire

### 2.1.4.1 Protocole d'extraction de l'ADN (Annexe 7)

### 2.1.4.2 Réaction de PCR

#### 🧪 Préparation de la gamme étalon

La solution mère de plasmide fournie est concentrée à  $7,5 \cdot 10^9$  copies/5 $\mu$ L. Pour obtenir une solution de plasmide concentrée à  $10^7$  copies/5 $\mu$ L, on effectue deux dilutions:

- Dilution 1 : 4  $\mu$ L de la solution mère + 396  $\mu$ L d'eau milliQ. On obtient ainsi une solution à  $7,5 \cdot 10^7$  copies/5 $\mu$ L.
- Dilution 2 : 10  $\mu$ L de la dilution 1 + 65  $\mu$ L d'eau milliQ. On obtient alors une solution à  $10^7$  copies/5 $\mu$ L.

Une dilution en cascade au  $1/10^e$  est alors réalisée à partir de la solution à  $10^7$  copies/5 $\mu$ L pour établir une gamme étalon à sept niveaux de concentrations. Pour cela, 10  $\mu$ L de la solution à  $10^7$  copies/5 $\mu$ L est mélangé à 90 $\mu$ L d'eau milliQ pour obtenir une solution à  $10^6$

copies/5µl. Le tube est passé au vortex pendant 20 secondes, puis 10 µl de la solution à 10<sup>6</sup> copies/5µl sont mélangés à 90 µl d'eau milliQ pour obtenir une solution concentrée à 10<sup>5</sup> copies/5µl. Ainsi de suite jusqu'à établir une gamme d'étalon avec des concentrations de 10<sup>7</sup> copies/5µl à 10 copies/5µl.

#### Préparation des contrôles

Nous avons utilisé 2 contrôles positifs pris dans la gamme standard : le contrôle positif fort (10<sup>7</sup> copies/5µl) et le contrôle positif intermédiaire (10<sup>2</sup> copies/5µl). Ces contrôles sont passés dans chaque série.

Un contrôle négatif(ou blanc) à base d'eau milliQ sera également inclus dans la série.

#### Préparation des amorces

Les amorces utilisées ciblent une zone de 98 paires de base (pb) du gène de la polymérase virale située aux positions nucléotidiques 1186 à 1283. Les séquences des amorces sens et anti-sens sont présentées dans le tableau IV ci-dessous.

**Tableau IV: Amorces sens et anti-sens utilisées pour la PCR maison**

	SEQUENCE	LOCALISATION
AMORCE SENS	5' GCT GAC GCA ACC CCC ACT 3'	1186-1203
AMORCE ANTI-SENS	5' AGG AGT TCC GCA GTA TGG 3'	1266-1283

Les solutions mères d'amorces fournies dans le commerce sont concentrées à 100 µM. Ces amorces sont diluées à 7,5 µM avant leur utilisation dans le mix de la réaction.

#### Préparation du Mix pour la PCR

Pour 1 échantillon, le volume total de Mix est de 20 µl :

- 12,5µL SYBR® Green Supermix
- 1µL d'amorce sens (7,5 µM)
- 1µL amorce anti-sens (7,5 µM)

- 5,5 µl H<sub>2</sub>O

Selon le nombre d'échantillons à analyser, le volume approprié de chacun des réactifs doit être calculé. Les contrôles positif et négatif, ainsi que les solutions de la gamme standard doivent être pris en compte dans ce calcul.

### Préparation de la plaque PCR

Les plaques PCR utilisées sont des plaques de 96 puits. Un plan de la plaque de PCR doit être réalisé au préalable. Un exemple de plan est présenté dans le tableau V ci-dessous.

Les échantillons sont passés en double afin d'augmenter la signification statistique du test.

**Tableau V: Plan de la plaque PCR**

STD= standard ; CTL+ = contrôle positif faible ( $10^2$  copies/5µl) ; CTL+++ = contrôle positif fort ( $10^7$  copies/5µl) ; UNK= unknown ou inconnu (prélèvements à analyser)

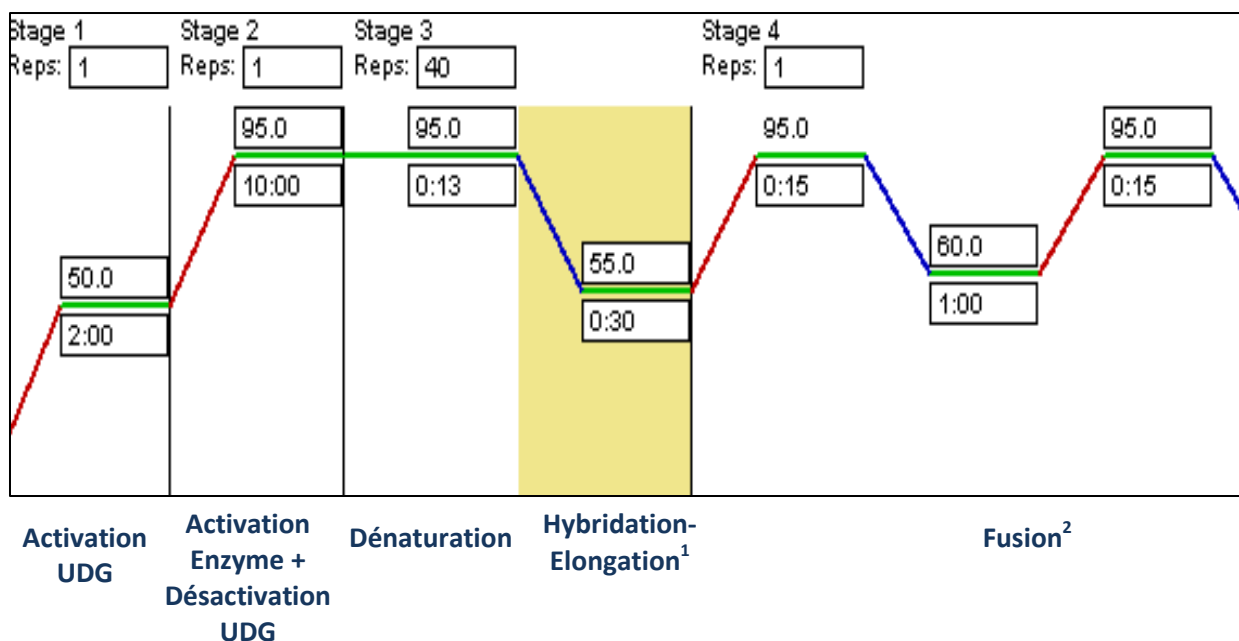
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	Blanc	CTL+	CTL+	UNK 7	UNK 7						
B	STD $10^7$	STD $10^7$	CTL+++	CTL+++	UNK 8	UNK 8						
C	STD $10^6$	STD $10^6$	UNK 1	UNK 1	UNK 9	UNK 9						
D	STD $10^5$	STD $10^5$	UNK 2	UNK 2	UNK 10	UNK 10						
E	STD $10^4$	STD $10^4$	UNK 3	UNK 3								
F	STD $10^3$	STD $10^3$	UNK 4	UNK 4								
G	STD $10^2$	STD $10^2$	UNK 5	UNK 5								
H	STD 10	STD 10	UNK 6	UNK 6								

Sous la hotte, ajouter 20 µl de mix dans chaque puits. En dehors de la hotte, rajouter 5 µl d'extrait ADN. Pour le blanc, 5 µl d'eau milliQ est rajoutée à la place de l'extrait d'ADN.

Après remplissage de la plaque, un film adhésif est ajouté pour couvrir la plaque et éviter l'évaporation de son contenu au cours des variations thermiques de la PCR.

Puis, une centrifugation de la plaque à 300 tours par minute pendant 5 min est nécessaire pour éliminer les bulles d'air, et assurer le dépôt de toutes les gouttelettes au fond des puits.

Placer la plaque dans le système ABI 7300 et lancer le processus selon le programme de thermocyclage suivant. (Figure 27)



**Figure 27: Programme de températures sur ABI 7300**

<sup>1</sup> L'élongation est réalisée à la température de transition entre l'hybridation et la nouvelle dénaturation (entre 55° et 95°C)

<sup>2</sup> L'étape 4 permet de tracer la courbe de dissociation. Cette étape comprend une phase de 15 sec à 95°C, puis 1 minute à 60°, 15 sec à 95° et enfin 15 sec à 60°C

## 2.1.5 Lecture et analyse des données de la PCR

### 2.1.5.1 Lecture des résultats

Les résultats bruts de charge virale sérique donnés par le système informatique couplé à l'ABI 7300 ne peuvent être interprétés tels quels. Ces résultats sont exprimés en copies pour 5 µl d'extrait d'ADN. Ces 5 µl proviennent de 200µl de plasma mis en suspension dans 200µl (ou 100 µl) d'eau milliQ (pour l'élution).

En tenant compte de cette dilution, et du facteur de conversion permettant d'exprimer les résultats en copies/ml de sérum, le facteur de conversion final (F) est calculé comme suit :

$$\frac{\text{Volume d'éluat}}{\text{Volume d'extrait amplifié}} \times \frac{1000}{\text{Volume de plasma extrait}}$$

Dans le cas où l'élution est réalisée dans 200 µl d'eau milliQ,  $F = (200/5) \times (1000/200) = 200$

⇒ **Nombre de copies/ml dans le sérum testé= copies/5µl (résultat brut) x 200**



### 2.1.5.2 Analyse des données de la PCR

#### ✚ Contrôle qualité

Il faut d'abord s'assurer que les contrôles positifs donnent des valeurs proches de  $10^2$  et  $10^7$  copies/5 $\mu$ l. Ces éléments sont nécessaires au contrôle qualité de chaque série passée afin de valider la série.

#### ✚ Qualité générale des résultats

Au moment de l'analyse des résultats, il faut regarder les courbes d'amplification : elles doivent être parallèles.

De plus, les duplicata doivent être de bonne qualité c'est-à-dire que les valeurs de Ct des duplicata doivent être les plus proches possibles (une différence de 1 cycle au maximum entre les duplicates).

#### ✚ Qualité de la courbe standard

La courbe standard doit être validée ; pour cela il faut calculer l'efficacité E de l'amplification.

$$E=10^{-1/s} - 1$$

« s » est la pente de la droite de calibration.

L'efficacité idéale (100%) est obtenue pour  $s = -3,32$  ; dans ce cas on considère que la quantité d'amplicons double à chaque cycle.

En pratique, une bonne efficacité est comprise entre 90 et 110%, c'est-à-dire que la pente doit varier entre -3,58 et -3,10 (D'après le fournisseur Invitrogen). Dans le cas où  $E > 110\%$ , il est possible qu'il y ait formation de dimères d'amorces, amplification d'ADN non spécifique, erreurs expérimentales (dilutions, pipetage, pipettes mal calibrées,...), ligne de base incorrecte.

Une Efficacité  $< 90\%$  peut être due à la présence d'inhibiteurs, des amorces mal dessinées, des conditions réactionnelles suboptimales, des erreurs expérimentales (dilutions, pipetage...), une ligne de base incorrecte.

D'autre part, le coefficient de détermination  $r^2$  (ou le carré du coefficient de corrélation  $r$ ) est de 0,99 dans les conditions optimales, et est acceptable pour  $r^2 > 0,95$ . Il indique l'intensité de la liaison entre le Ct et log base 10 des concentrations initiales en molécules cibles.

## **2.2 Evaluation des critères de performance de la technique « maison »**

Pour valider la technique maison de mesure de charge virale du VHB, nous avons choisi de suivre les recommandations du Comité Français d'accréditation (COFRAC) pour la validation des méthodes d'analyse quantitatives (portée flexible de type B). Nous avons alors déterminé les paramètres suivants : la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la justesse, l'incertitude et la contamination inter-échantillons. Nous avons ensuite comparé nos résultats avec ceux d'une méthode de référence (m2000).

### **2.2.1 Fidélité**

#### **2.2.1.1 Répétabilité**

Au cours de l'essai, nous avons testé 2 niveaux de concentration de la gamme standard :  $10^7$ , et  $10^2$  copies/5 $\mu$ l. Chacun de ces niveaux a été répété 30 fois, au cours d'un seul et même essai réalisé par le même opérateur, utilisant le même lot de réactifs, les mêmes instruments, et le même étalonnage.

L'exploitation des résultats a consisté à calculer la moyenne ( $m$ ), l'écart-type ( $s$ ) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

Le CV est exprimé en pourcentages et a été calculé comme suit :

$$\text{CV en \%} = (s/m) \times 100$$

#### **2.2.1.2 La fidélité intermédiaire**

Au cours de l'essai, nous avons testé les 2 niveaux de concentration du contrôle de qualité ( $10^7$  et  $10^2$  copies/5 $\mu$ l). Chacun de ces niveaux a été répété 10 fois, au cours de séries réalisées en des jours différents (ou par des opérateurs différents).

L'exploitation des résultats a consisté, comme pour la répétabilité, à calculer le coefficient de variation selon la formule décrite ci-dessus.

### 2.2.2 Justesse

La justesse, quantifiée par le biais, est estimée en comparant la moyenne (**m**) obtenue lors de l'étude de fidélité intermédiaire (établie sur les échantillons de contrôle positif intermédiaire à  $10^2$  copies/5  $\mu$ l, et du contrôle positif fort à  $10^2$  copies/5  $\mu$ l) à la valeur "vraie" (**v**), connue, de l'échantillon testé. Elle est exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

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

### 2.2.3 Incertitude

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

Soit **U<sub>1</sub>** l'écart type de la composante d'incertitude due à la reproductibilité intra-laboratoire et **U<sub>2</sub>** la composante d'incertitude due à l'erreur de justesse (E justesse).

U<sub>1</sub> = écart type de la reproductibilité

U<sub>2</sub> = (E justesse) /  $\sqrt{3}$  avec E justesse = (m - v)

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

l'incertitude combinée (U<sub>c</sub>)=  $U_c = \sqrt{U_1^2 + U_2^2}$

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 :

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

### 2.2.4 Contamination entre les échantillons

L'étude de la contamination inter-échantillons est effectuée selon le plan de plaque suivant, en analysant un échantillon de valeur élevée (ou positif fort) 3 fois consécutivement (H1, H2,

H3, de moyenne mH) suivi d'un échantillon à valeur basse également analysé 3 fois (B1, B2, B3). Les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) sont répétées 5 fois afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3).

**Tableau VI: Plan de la plaque PCR pour l'évaluation de la contamination inter-échantillons**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blanc	Blanc	CTL+	CTL+	H1	H3	B2					
<b>B</b>	STD 10 <sup>7</sup>	STD 10 <sup>7</sup>	CTL+++	CTL+++	H2	B1	B3					
<b>C</b>	STD 10 <sup>6</sup>	STD 10 <sup>6</sup>	H1	H1	H3	B2						
<b>D</b>	STD 10 <sup>5</sup>	STD 10 <sup>5</sup>	H2	H2	B1	B3						
<b>E</b>	STD 10 <sup>4</sup>	STD 10 <sup>4</sup>	H3	H3	B2	H1						
<b>F</b>	STD 10 <sup>3</sup>	STD 10 <sup>3</sup>	B1	B1	B3	H2						
<b>G</b>	STD 10 <sup>2</sup>	STD 10 <sup>2</sup>	B2	B2	H1	H3						
<b>H</b>	STD 10	STD 10	B3	B3	H2	B1						

Le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon la formule :

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

### 2.2.5 Comparaison de la technique maison du SYBR Green avec une technique de référence (m2000)

Pour comparer notre technique maison avec la technique de référence m2000, nous avons passé 69 échantillons en parallèle par les 2 méthodes.

La comparaison des 2 techniques a consisté à évaluer la corrélation et la concordance entre les 2 méthodes.

### 3 Analyse statistique

Le logiciel Excell a permis la saisie des données, la conversion des résultats de charge virale, le calcul de certaines valeurs statistiques (moyenne, écart-type...) et le tracé de certains graphiques.

Une analyse statistique est également nécessaire pour la comparaison des techniques entre elles afin de tester la corrélation et la concordance entre Taqman et m2000 d'une part, et entre la technique m2000 et la technique maison d'autre part.

Cette analyse a consisté à établir les graphiques suivants à l'aide d'un logiciel de comparaison Methval :

- **Le diagramme de dispersion** : les valeurs de charge virale obtenues avec la technique à comparer sont reportées en ordonnées et celles de la technique considérée comme référence en abscisse. Chaque échantillon est représenté par un point. La relation mathématique entre les techniques est estimée par la droite de régression selon Passing et Bablok, et la corrélation entre les 2 techniques est évaluée.
- **Le diagramme de Bland-Altman** : Il présente en ordonnées les différences de mesure de charge virale (en log<sub>10</sub> copies/ml) entre les 2 méthodes, et en abscisse la moyenne des valeurs de charge virale des 2 méthodes. Ce diagramme permet d'évaluer le niveau d'accord entre les 2 techniques par le calcul du biais et des limites de concordance (J.M. Bland, Altman, D.G., 1986). Le biais est la moyenne des différences des valeurs de charge virale mesurées par les 2 techniques. Les limites de concordance correspondent à biais ± 2 Ecart-type, et entre lesquelles se trouvent 95% des valeurs des différences.

## Chapitre III : RESULTATS

### 1 Analyse des performances du m2000

Pour évaluer la technique m2000, nous avons comparé les valeurs de charge virale VHB pour 20 échantillons passés en parallèle sur la technique m2000 et Taqman. Dans cette comparaison, la technique Taqman est considérée comme technique de référence.

Les résultats de charge virale obtenus par les 2 techniques sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII: Résultats de charge virale m2000/Taqman

Charge virale	Identification	Taqman (log UI/ml)	m2000 (log UI/ml)	Différence $\Delta$ log
IndéTECTABLE	BIO-1	<1,3	<1	0
	BIO-12	<1,3	1,1	0
	BIO-13	<1,3	IND	0
[1,3-3 log]	BIO-18	1,76	1,91	0,15
	BIO-2	2,04	2,34	0,3
	BIO-20	2,25	2,3	0,05
	BIO-15	2,44	2	-0,44
	BIO-11	2,45	2,74	0,29
	BIO-19	2,61	2,08	-0,53
	BIO-16	2,67	2,49	-0,18
	BIO-14	2,68	2,54	-0,14
	BIO-10	2,92	3,14	0,22
	BIO-17	2,99	2,64	-0,35
>3 log	BIO-8	3,34	3,03	-0,31
	BIO-9	3,36	3,72	0,36
	BIO-5	3,97	3,3	-0,67
	BIO-7	5,06	5,21	0,15
	BIO-4	5,08	5,02	-0,06
	BIO-6	5,25	5,6	0,35
	BIO-3	7,77	8,37	0,6

$\Delta \log = 0,265$

$\Delta \log = 0,36$

Sur les 20 échantillons testés, 3 étaient inférieurs au seuil de quantification des 2 techniques, 10 échantillons avaient des charges virales comprises entre 1,3 et 3 log (UI/ml) et 7 échantillons avaient des charges virales > 3,3 log.

La différence moyenne de charge virale entre les 2 techniques est de 0.26 log UI/ml (inférieure à 0,5 log UI/ml, valeur admissible entre 2 techniques commerciales).

La comparaison des 2 techniques a été effectuée par l'analyse de la droite de régression (selon Passing-Bablok) et du diagramme des différences (Bland-Altman).

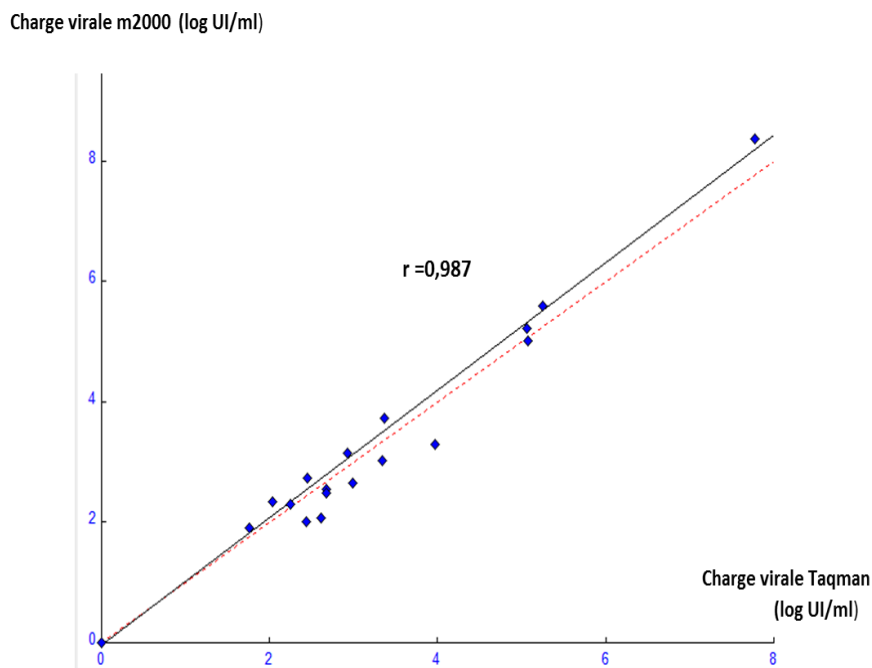


Figure 28: Droite de régression Taqman VS m2000

La droite de régression est réalisée en reportant les valeurs de charge virale obtenues par la méthode testée (m2000) par rapport à celles de la technique de référence (Taqman).

La  **pente**  de la droite de régression est de 1,057 (intervalle de confiance IC à 95% [0,933 à 1,139]).  **L'ordonnée à l'origine**  est proche de 0 et est égal à -0,039 [-0,428 à 0,121] et le  **coefficient de corrélation**   $r = 0,987$ .

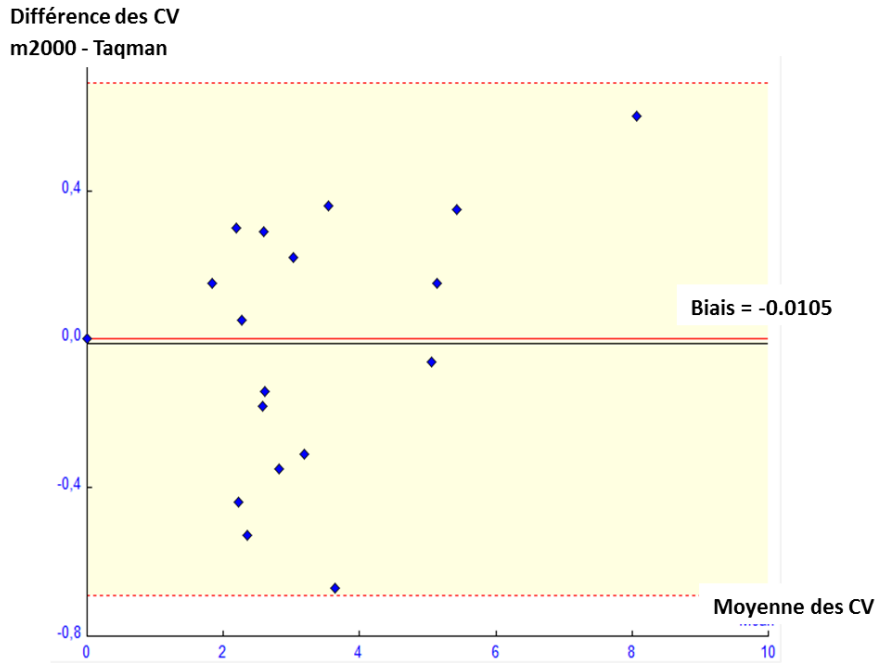


Figure 29: Bland-Altman Taqman VS m2000

La concordance entre les 2 techniques est évaluée par le **biais**. Ce biais est très faible et est égal à -0,0105 [-0,165 à 0,144] entre les techniques Taqman et m2000. La moyenne générale des différences de charge virale est de 0.26 log (UI/ml).

## 2 Evaluation des performances de la technique « maison »

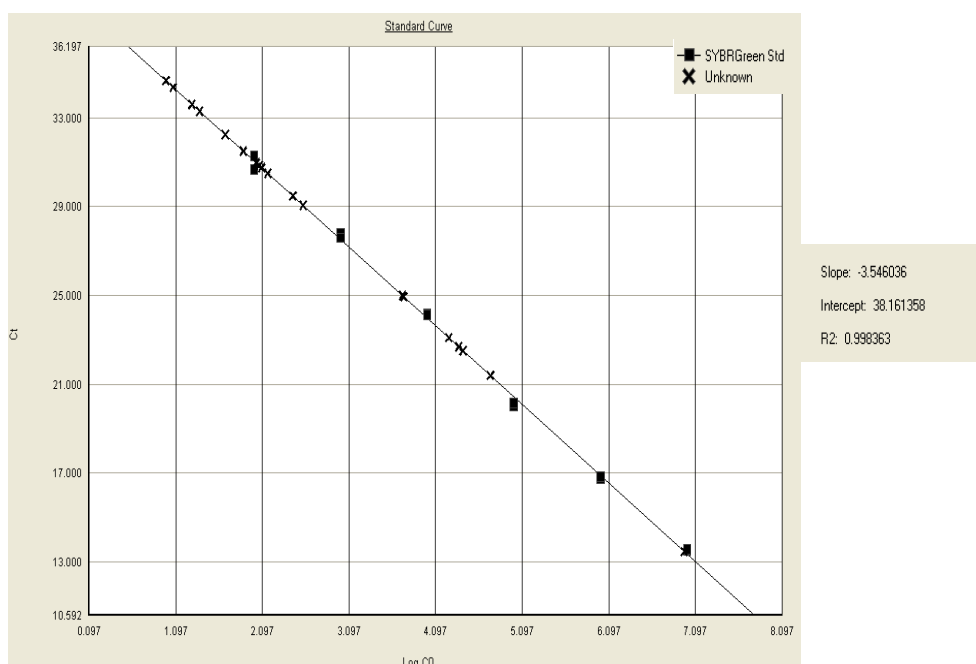
Nous avons testé la charge virale de 69 échantillons de plasma/sérum (en 8 séries). L'étude des données de la PCR a consisté à analyser la droite standard, les contrôles, et la courbe de fusion.

### 2.1 Analyse des données de la PCR maison

#### 2.1.1 La droite standard

La droite standard (ou droite d'étalonnage), obtenue à partir des points de la gamme standard est la représentation graphique du cycle seuil (Ct) en fonction du logarithme de la concentration d'amplicons. Un exemple de droite standard est présenté dans la figure 30.





**Figure 30: Exemple de droite standard (série du 06/06/2013)**

La pente des différentes droites standards obtenues est comprise entre -3,13 à -3,59 ; soit une efficacité de PCR comprise entre **90** et **108.6%**.

Le carré du coefficient de corrélation ( $r^2$ ) est supérieur ou égal à **0,99** pour la majorité des séries, sauf pour une série où ce coefficient est égal à 0,98. Une valeur du coefficient de détermination supérieure à 0,95 est acceptable.

L'analyse de cette droite nous permet d'affirmer l'efficacité de la PCR, l'absence d'erreurs de pipetage ou d'autres erreurs expérimentales, ainsi que l'absence d'inhibiteurs de PCR.

### 2.1.2 Les contrôles

Deux niveaux de contrôles positifs ont été utilisés : un contrôle positif fort ( $10^7$  copies/ $5\mu\text{l}$  soit 9,3 log) et intermédiaire ( $10^2$  copies/ $5\mu\text{l}$  soit 4,3 log). La vérification des valeurs des contrôles est indispensable pour la validation de la série. Les valeurs obtenues sont respectivement égales à 4,42 log et 9,38 log, respectivement pour les contrôles positifs intermédiaire et fort.

L'analyse de la droite standard ainsi que des contrôles nous permet de conclure à la validité des séries d'échantillons analysés.

### 2.1.3 La courbe de fusion

La spécificité de l'amplification de l'ADN du VHB est évaluée par la présence d'un seul point de flexion à une température unique comprise entre 80 et 85°C. La dérivée de la fluorescence en fonction de la température, représentée dans la figure 31, permet de confirmer la spécificité d'amplification de l'ADN cible du VHB.

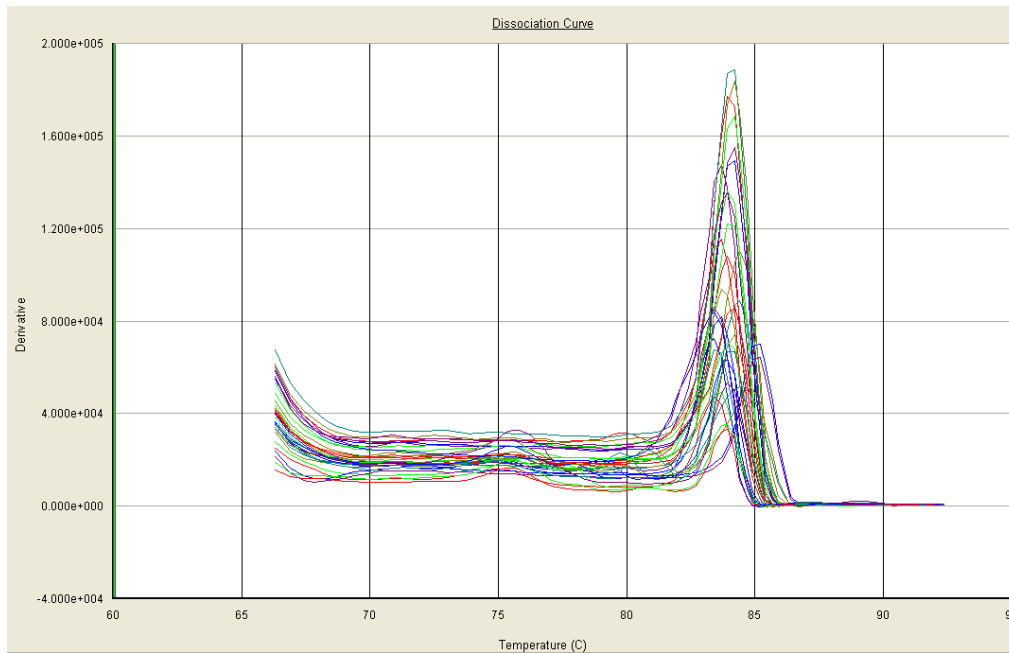


Figure 31: Exemple de courbe de fusion (série du 06/06/2013)

## 2.2 Etude des critères de performance de la PCR « maison »

### 2.2.1 Evaluation de la fidélité

#### 2.2.1.1 Répétabilité

La répétabilité de la technique a été évaluée en testant 2 niveaux de concentration ( $10^2$  et  $10^7$  copies/5 $\mu$ l soit  $2,10^4$  copies/ml et  $2,10^9$  copies/ml respectivement). Ces 2 concentrations ont été testées 30 fois chacune, dans une même série. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VIII.

**Tableau VIII: Résultats de la répétabilité de la technique maison**

	Répétabilité 4,3	Répétabilité 9,3
	log	log
Valeurs	3,91	9,33
	4,10	9,36
	4,16	9,40
	4,29	9,45
	4,18	9,43
	4,28	9,45
	4,11	9,28
	4,04	9,29
	4,16	9,36
	4,28	9,44
	4,35	9,43
	4,31	9,53
	4,12	9,38
	4,09	9,36
	4,05	9,26
	4,12	9,26
	4,24	9,41
	4,33	9,46
	4,32	9,44
	4,28	9,57
4,27	9,39	
4,23	9,35	
4,07	9,36	
4,07	9,38	
4,22	9,71	
4,35	9,65	
4,38	9,65	
4,31	9,71	
4,19	9,49	
4,12	9,44	
<b>Moyenne (M)</b>	<b>4,2</b>	<b>9,4</b>
<b>Ecart type (ET)</b>	<b>0,115</b>	<b>0,121</b>
<b>Coefficient Variation (%)</b>	<b>2,74</b>	<b>1,28</b>

Les coefficients de variation obtenus sont de 2,74% et 1,28% respectivement pour les concentrations intermédiaire et for  $2,10^4$  copies/ml et  $2,10^9$  copies/ml.

### **2.2.1.2 Fidélité intermédiaire**

La reproductibilité intra-laboratoire de la technique a été évaluée en testant les 2 niveaux de concentration des contrôles (CTL)  $10^2$  et  $10^7$  copies/5 $\mu$ l soit  $2,10^4$  copies/ml et  $2,10^9$  copies/ml respectivement. Les coefficients de variation obtenus sont respectivement de 2,44% et 1,37% pour ces 2 concentrations.

**Tableau IX: Résultats de l'analyse de reproductibilité intra-laboratoire de la technique maison**

	CTL positif intermédiaire (4,3 log)	CTL positif fort (9,3 log)
Date		
	11/04/2013	4,59
	23/04/2013	4,39
	10/05/2013	4,32
	13/05/2013 : 10h	4,43
	13/05/2013 : 13h	4,23
	13/05/2013 : 15h	4,47
	14/05/2013	4,55
	28/05/2013	4,38
	30/05/2013	4,51
	06/05/2013	4,36
	<b>Moyenne (M)</b>	<b>4,42</b>
	<b>Ecart type (ET)</b>	<b>0,11</b>
	<b>Coefficient de variation (%)</b>	<b>2,44%</b>
		<b>9,38</b>
		<b>0,13</b>
		<b>1,37%</b>

Les coefficients de variation obtenus pour les 2 niveaux sont bas (<5%), donc 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 32 et 33**).

Ce diagramme permet de représenter les différents points des contrôles selon 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.

### Charge virale

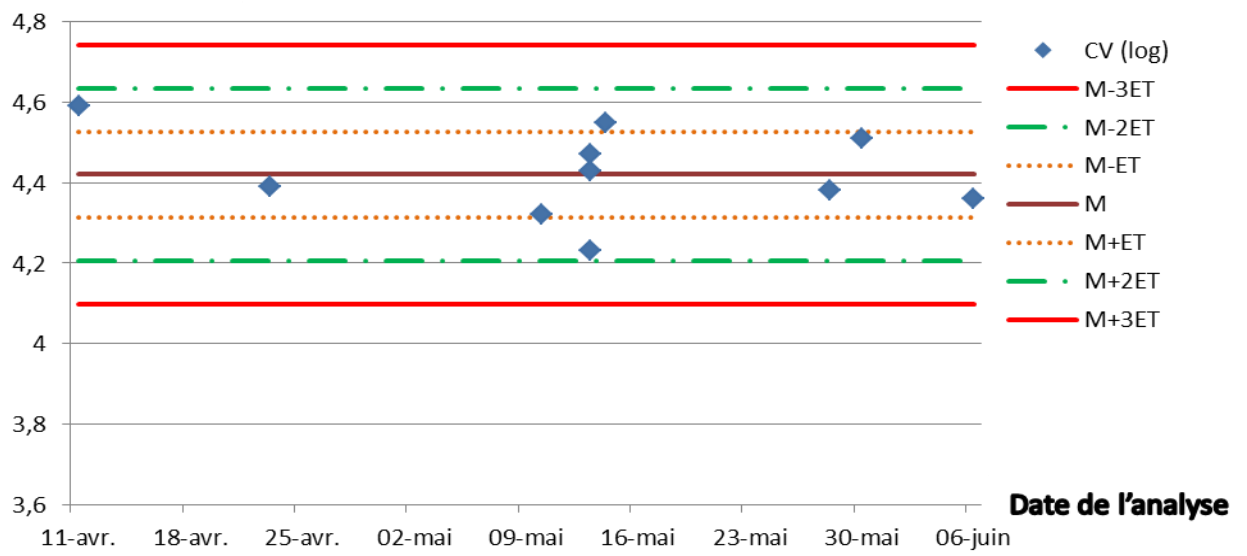


Figure 32: Diagramme de Levey-Jennings du contrôle positif à concentration moyenne

### Charge virale

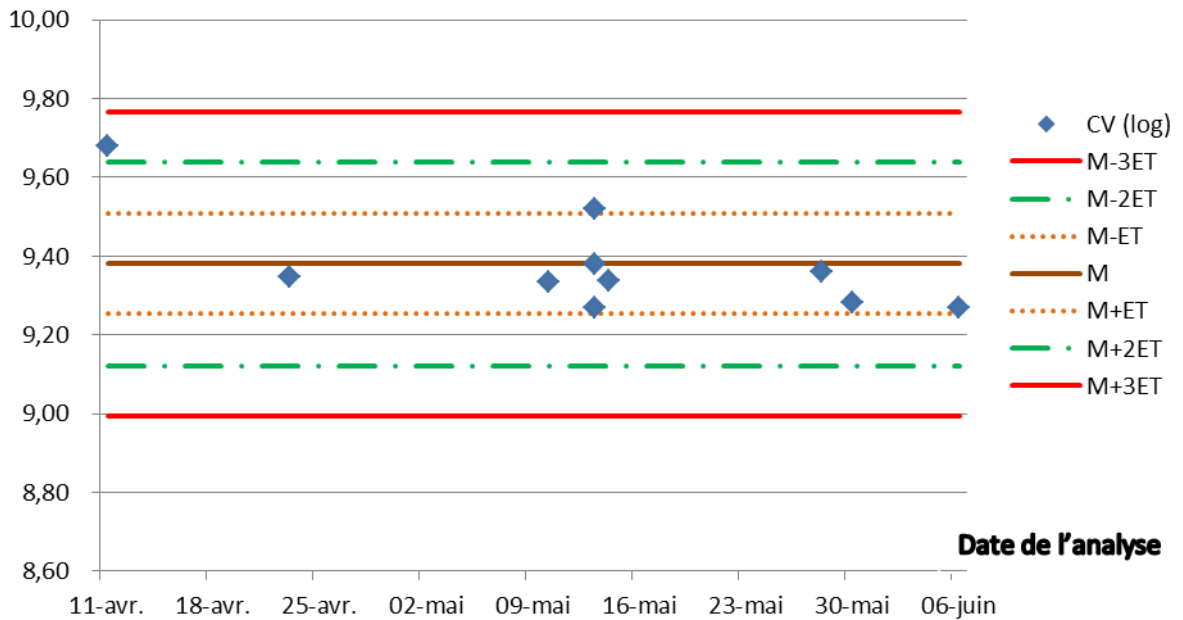


Figure 33: Diagramme de Levey-Jennings du contrôle positif à forte concentration

La figure 32 montre que les valeurs de contrôles positifs de concentration moyenne sont comprises entre  $M \pm ET$  pour 70% des valeurs. Les 30% restants ne dépassent pas  $M \pm 2 ET$ .

Dans la figure 33, on observe que 90% des valeurs des contrôles positifs de concentration élevée ne dépassent pas  $M \pm 1ET$  ; 10% des valeurs sont supérieures à  $M \pm 2 ET$  sans dépasser  $M \pm 3ET$ .

Aucune des erreurs citées précédemment n'a été rencontrée au cours de nos séries.

## 2.2.2 Calcul de la justesse

Nous avons évalué la justesse en utilisant les contrôles positifs intermédiaire ( $10^2$  copies / 5ul) et fort  $10^7$  copies / 5 $\mu$ l en appliquant la formule suivante :

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

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Pour le Contrôle positif Intermédiaire  $10^2$  copies / 5 $\mu$ l soit 4,30 log copies/ ml

$$m = 4,42 \text{ log copies/ ml}$$

$$V = 4,30 \text{ log copies/ ml}$$

$$\text{Justesse} = (4,42 - 4,30) \times 100 / 4,30$$

$$\text{Justesse} = \mathbf{2.79 \%}$$

- Pour le Contrôle positif fort  $10^7$  copies / 5 $\mu$ l soit 9.30 log copies/ ml

$$m = 9,38 \text{ log copies/ ml}$$

$$V = 9,30 \text{ log copies/ ml}$$

$$\text{Justesse} = (9,38 - 9,30) \times 100 / 9,30$$

$$\text{Justesse} = \mathbf{0.86 \%}$$

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

### 2.2.3 Calcul de l'incertitude

Au cours de notre étude, nous avons calculé les valeurs des incertitudes pour les contrôles positifs forts et intermédiaires utilisés en utilisant les formules suivantes :

$$\mathbf{R = valeur mesurée +/- U \quad (unité)}$$

U1 = écart type de la reproductibilité

$$U2 = (E \text{ justesse}) / \sqrt{3} \quad \text{avec } E \text{ justesse} = (m - v)$$

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 Contrôle positif Intermédiaire  $10^2$  copies / 5 $\mu$ l soit 4,30 log copies/ ml

$$U1 = 0,107 \quad U2 = (4,42 - 4,3) / \sqrt{3} \Rightarrow U_c = 0,127 \text{ et } 2U_c = 0,25$$

$$\mathbf{R = Valeur mesurée \pm 0,25 \log \text{ copies/ml}}$$

- Pour le Contrôle positif fort  $10^7$  copies / 5 $\mu$ l soit 9,30 log copies/ ml

$$U1 = 0,129 \quad U2 = (9,38 - 9,30) / \sqrt{3} \Rightarrow U_c = 0,137 \quad 2U_c = 0,27$$

$$\mathbf{R = Valeur mesurée \pm 0,27 \log \text{ copies/ml}}$$

### 2.2.4 Contamination

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

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

Avec B étant un contrôle à concentration intermédiaire ( **$10^2$  copies/5 $\mu$ l** soit 2 log copies/ml) et H un contrôle à concentration élevée ( **$10^7$  copies/5 $\mu$ l** soit 9 log copies/ml).

Nous avons obtenu les valeurs suivantes :

$$\mathbf{mB1 = 4,85 \log \text{ copies/ml}}$$

$$\mathbf{mB3 = 4,79 \log \text{ copies/ml}}$$

**mH** = 9,47 log copies/ml

$$\text{Contamination en \%} = \frac{(4,85-4,79)}{(9,47-4,79)} \times 100 = \boxed{1,28 \%}$$

### 2.3 Comparaison des méthodes SYBR Green VS m2000

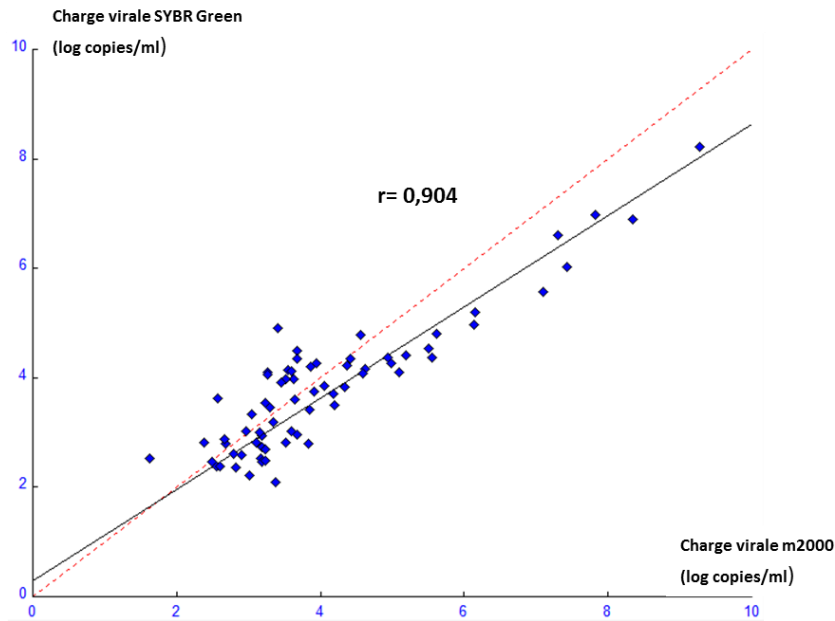
Pour cette comparaison, nous avons choisi 69 échantillons présentant des charges virales comprises entre 1,63 et 9,28 log copies/ml (sur m2000), couvrant l'étendue du domaine physiopathologique. Le tableau X représente la répartition des charges virales sur 3 niveaux de concentration prédéfinis : faible (<3,83 log copies/ml), intermédiaire ([3,83-5,83] log copie/ml), et élevée (> 5,83 log copies/ml).

**Tableau X: Répartition des résultats de m2000 selon les valeurs de charge virale**

Charge virale (log <sub>10</sub> copies/ml)	Effectif	Pourcentage (%)
<3,83	39	56,5
[3,83 - 5,83]	22	31,9
>5,83	8	11,6
TOTAL	69	100

Pour ces 69 échantillons, la charge virale a été mesurée également par la technique maison du SYBR Green et les données des 2 techniques ont été comparées (Annexe 8). Cette comparaison a été d'abord réalisée par le tracé du diagramme de dispersion et du diagramme de Bland-Altman, représentés dans les figures 34 et 35.

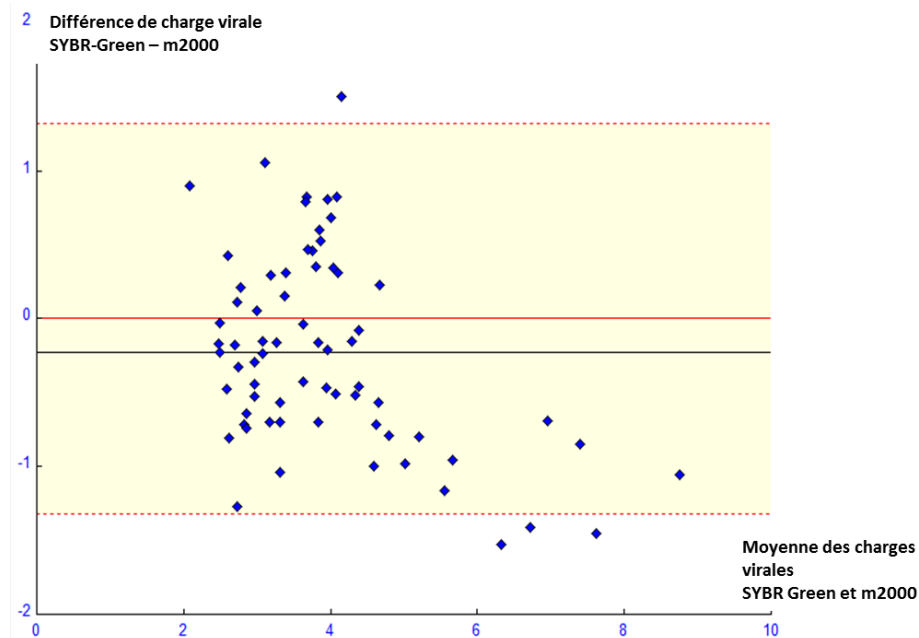




**Figure 34: Droite de régression m2000 VS SYBR Green**

Les valeurs de charge virale obtenues par m2000 sont reportées en ordonnée et celles du m2000 en abscisse. 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).

La **pente** de la droite est de 0,836 [0,743 à 0,947]. Son **ordonnée à l'origine** est égale à 0,284 [-0,126 à 0,662] et le **coefficient de corrélation**  $r = 0,904$ .



**Figure 35: Bland-Altman SYBR Green VS m2000**

Représentation de la différence de charge virale entre la technique maison et m2000 (charge virale SYBR Green – charge virale m2000) en ordonnées et la moyenne de la charge virale des deux techniques en abscisse. Les limites de concordance sont représentées par les 2 traits rouges en pointillés, le trait noir représente le biais.

Le biais observé est de **-0,259** [-0,417 à -0,101]. Ce biais, ainsi que le diagramme Bland-Altman montrent que la majeure partie des résultats obtenus par la technique maison SYBR Green sont légèrement sous quantifiés par rapport à la technique du m2000.

Nous avons par la suite calculé les différences de charge virale entre les deux techniques pour chaque échantillon. La moyenne globale des différences de charge virale entre les deux techniques est de **0.59** log (copies/ml).

Sachant que la différence  $\Delta$  log acceptable entre 2 techniques est  $\Delta \leq 0.5$  log UI/ml, nous avons réparti les différences de mesures de charge virale entre la technique maison et celle du m2000 sur 3 niveaux :  $\Delta \leq 0.5$  log UI/ml (soit  $\Delta \leq 1$  log copies/ml),  $0,5 < \Delta \leq 1$  log UI/ml (soit  $1 < \Delta \leq 1,5$  log copies/ml) et  $\Delta > 1$  (soit  $\Delta \geq 1,5$  log copies/ml). Les résultats sont présentés dans le tableau XI.

**Tableau XI: Répartition des différences de charge virale entre m2000 et la technique SYBR Green**

Différence charge virale ( $\Delta \text{ Log}_{10} \text{ UI/ml}$ )	Différence charge virale ( $\Delta \text{ Log}_{10} \text{ copies/ml}$ )	Effectif	Pourcentage (%)
$\Delta \leq 0.5$	$\Delta \leq 1$	58	84,05
$0,5 < \Delta \leq 1$	$1 < \Delta \leq 1,5$	10	14,49
$\Delta > 1$	$\Delta > 1,5$	1	1,45
	TOTAL	69	100

Nos résultats ont montré que 84 % des échantillons testés sur les 2 techniques étaient concordants avec une différence  $\Delta \leq 1$  log copies/ml. De plus, sur les 11 (16%) échantillons discordants ( $\Delta > 1$ ), 10 présentaient une différence  $1 < \Delta \leq 1,5$  log copies/ml.

Ensuite, nous avons réparti les différences de charge virale entre les 2 techniques en fonction des 4 niveaux de concentration suivants : Concentration faible inférieure à 3,53 log copies (soit < 1000 UI), concentration modérée comprise entre 3,53 et 4,53 log (soit entre 1000 et 10 000 UI/ml), concentration élevée entre 4,53 et 5,53 log (soit entre 10000 et 100 000 UI/ml) et concentration très élevée > à 5,53 log (soit >100 000 UI/ml). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII: Répartition des différences de charge virale en fonction des niveaux de charge virale

Concentration (Log copies/ml)	Différences $\Delta$ (Log Copies/ml)			Total
	$\Delta < 1$	$1 < \Delta < 1,5$	$\Delta > 1,5$	
< 3,53	29 (90,62%)	3 (9,38%)	0	32
[3,53 - 4,53]	<b>18 (94,74%)</b>	<b>1 (5,26%)</b>	<b>0</b>	<b>19</b>
] 4,53 - 5,53]	<b>7 (87,5%)</b>	<b>1 (12,5%)</b>	<b>0</b>	<b>8</b>
> 5,53	4 (40%)	5 (50%)	1 (10%)	10
				69

En considérant l'intervalle d'intérêt clinique, compris entre [3,53 - 5,53] log copies/ml (soit 1000-100000 UI/ml) nous remarquons que 92,6 % des échantillons étaient concordants ( $\Delta < 1$  log copies/ml). Deux résultats discordants ont été observés dans cet intervalle avec  $\Delta$  compris entre 1 et 1,5 log copies/ml.

De plus, près de 54,5% des échantillons discordants avaient une charge virale élevée (>5,53 log copies/ml).

## 2.4 Comparaison du coût et de la durée de l'examen

L'efficacité de la technique « maison » repose non seulement sur les critères analytiques, mais dépend aussi du temps nécessaire pour la réalisation de l'essai, et du coût de l'analyse.

Nous avons donc comparé la durée de l'analyse et le coût des 3 techniques utilisées (Tableau XIII).

Tableau XIII: Comparaison du coût et de la durée moyenne de l'examen pour les 3 techniques de charge virale (m2000, Taqman, SYBR Green)

Techniques	Durée de l'analyse			Coût de l'analyse
	Extraction	Amplification	Interprétation résultats	
<b>m2000</b>	2h30	2h	Immédiat	<b>~45 000F</b> <sup>CFA</sup>
<b>COBAS Taqman</b>	2h15	3h30	Immédiat	<b>~35 000F</b> <sup>CFA</sup>
<b>SYBR Green</b>	2h30-3h00	1h50	30 min	<b>~14 000F</b> <sup>CFA</sup>

## CHAPITRE IV : DISCUSSION

La quantification plasmatique de l'ADN VHB est un outil important pour le suivi de l'évolution de l'hépatite B chronique puisqu'elle reflète directement l'état de la réplication virale. En outre, 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.

De nombreuses techniques pour la mesure de la charge virale VHB sont actuellement commercialisées. Les plus récentes reposent sur l'utilisation de la PCR en temps réel, et leurs performances ont été largement démontrées. Cependant, ces techniques ne sont pas toujours disponibles dans les pays à ressources limitées comme le Sénégal d'où l'intérêt d'entreprendre ce travail sur la mise en place et l'évaluation des performances d'une technique maison de PCR en temps réel utilisant le Sybr green I, pour 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 (m2000 Abbott Real Time). De nombreuses études ont permis de démontrer les performances du m2000 pour la quantification de l'ADN plasmatique du VHB. C'est ainsi qu'en France en 2007, **Thibault et collaborateurs** ont confirmé le seuil de détection (10 UI/ml) et l'intervalle de quantification (1 à 9 log UI/ml) donnés par le fabricant pour cette technique ; ils ont aussi montré que ces performances étaient meilleures que celles observées pour la technique Versant 3.0 utilisant la technologie de l'ADN branché. **(V. Thibault et coll., 2007)**

Tout d'abord, une vérification des performances de la technique m2000 a été réalisée par la comparaison avec une autre technique commerciale (Cobas Taqman). Cette technique présente une bonne sensibilité de 10-12 UI/ml et un large intervalle de quantification de 1,74-8,03 log UI/ml comme rapporté par l'étude de **Hochberger et collaborateurs** en Allemagne en 2006 **(S. Hochberger, et coll., 2006)**, et par celle, plus récente de **Pyne et collaborateurs** aux Etats-Unis **(M. T. Pyne et coll., 2012)**.

Nos résultats de comparaison m2000 vs Taqman montrent que les mesures de charge virale obtenues avec m2000 corrélaient fortement avec celles de la technique Taqman avec un très bon coefficient de corrélation de 0,987 entre les 2 techniques et un biais très faible (-0,0105).

Ce qui permet d'affirmer que les techniques Taqman et m2000 sont interchangeable. Ces résultats sont comparables voire meilleurs à ceux publiés en 2007 par **Thibault et coll. (V. Thibault, et coll., 2007)**, montrant une corrélation de 0,957 et un biais de -0,02 et à ceux publiés en 2008 en Italie, par **(M. Ciotti et coll., 2008)** montrant une corrélation  $r= 0,96$  et un biais de -0,25. De plus, ils trouvèrent que 81% des échantillons présentaient une différence de moins de 0,5 log (UI/ml) entre les 2 techniques (contre 90% dans notre étude) et 97 % avaient une différence de moins de 1 log (UI/ml) entre les 2 techniques (contre 100% dans notre étude). Toutefois, il faudrait ajouter que le nombre d'échantillons testés par **Thibault** ( $n=101$ ) et ceux testés par **Ciotti** ( $n= 100$ ) sont supérieurs à celui de notre étude ( $n=20$ ).

L'analyse des données de la PCR maison a montré une bonne linéarité de la droite standard entre  $10^2$  et  $10^7$  copies/5 $\mu$ l avec un bon coefficient de détermination supérieur à 0.99 (conditions optimales) pour la majeure partie des séries ainsi qu'une bonne efficacité de la réaction de PCR comprise entre 90 et 108,6% ( Normes : 90-110 %). Ces résultats permettent de confirmer que le protocole technique a été bien effectué, et assurent l'absence d'erreurs expérimentales (pipetage, dilutions...).

Le Sybr Green I est un agent intercalant qui se fixe de manière non spécifique à l'ADN double brin. La spécificité de l'amplification repose avant tout sur la spécificité du couple d'amorces utilisées. Cette spécificité est également assurée par l'utilisation de la Hotstart polymérase qui prévient la formation de dimères d'amorces, par la présence de l'Uracile N-glycosylase et des dUTP qui permettent l'élimination des amplicons contaminants du milieu, avant le début de l'amplification. Enfin, la courbe de fusion permet d'évaluer la spécificité de la réaction. Certaines séries d'analyse ont présenté quelques pics de faible fluorescence sur la courbe de fusion, différents du pic principal spécifique à l'ADN du VHB, indiquent qu'il pourrait y avoir une dimérisation des amorces.

Les coefficients de variation obtenus au cours de l'évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité de la technique maison sont faibles (<5%) et sont respectivement de 2% et 1,9% en moyenne. Les écarts-types calculés correspondants (rangés de 0.107 à 0,129) sont toujours inférieurs à 0,25 log copies, valeur maximale tolérée pour la variabilité analytique (comme indiqué dans l'étude de **Ciotti et collaborateurs**).

Nos coefficients de variation sont très proches de ceux obtenus par **Mendy et coll.** en Gambie en 2006 (1,08% et 1,72% en moyenne) (**M. E. Mendy et coll., 2006**) respectivement pour la répétabilité et la reproductibilité) et par **Oliosio et coll.** en Italie en 2007 (**D. Oliosio et coll., 2007**) (1,4 % et 2,8% en moyenne).

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 positifs intermédiaire et fort au fil du temps.

Ces deux études citées (**Oliosio** et collaborateurs ; **Mendy** et collaborateurs) ont également consisté évalué la PCR en temps réel utilisant le SYBR Green pour la quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B. Dans ces 2 études, les régions ciblées du génome viral sont différentes par rapport à notre étude (région du gène de la polymérase). En effet, dans l'étude réalisée par **Oliosio et coll** la région ciblée est une partie de la zone core couvrant 441 pb, et dans les travaux de **Mendy**, une région de 98pb du gène S a été ciblée.

La comparaison des valeurs de charge virales obtenues par la technique maison et celles mesurées par la technique m2000 a été réalisée sur 69 échantillons de plasma répartis sur presque tout l'intervalle de quantification du m2000. La taille de notre échantillonnage est proche de celui dans l'étude d'Oliosio et coll (n= 103), mais supérieur à celui choisi par Mendy et coll (n=10). Notre choix s'est porté sur un tel nombre par suivi des recommandations du COFRAC qui impose 30 échantillons au minimum pour la comparaison de techniques.

Suite à une évaluation de la corrélation et de la concordance entre les 2 techniques par les diagrammes de dispersion et de Bland-Altman, nous avons obtenu une corrélation raisonnable ( $r = 0,904$ ) et un biais de  $-0,284$ . Il est intéressant de préciser qu'au cours de notre étude, les charges virales comparées ont été exprimées en log copies/ml. Le biais ainsi obtenu pourrait être diminué si les résultats étaient exprimés en log (UI/ml). En effet, les travaux réalisés par **Ciotti et coll** sur la comparaison de la technique Abbott Real Time HBV et celle de Cobas Taqman indiquent que le biais entre les deux méthodes était de  $-0,246$  (log UI/ml) et que ce biais serait de  $-0,476$  lorsque les charges virales étaient exprimées en log (copies/ml). Ceci permet de mettre l'accent sur l'importance de la standardisation de l'unité

de charge virale et de l'utilisation de l'Unité Internationale pour réduire les différences et faciliter la comparaison des méthodes.

Les travaux d'**Olioso** ainsi que ceux de **Mendy** sur la comparaison de la technique Sybr Green et Amplicor (Cobas), corroborent plus ou moins bien avec nos résultats ( $r= 0,90$ ). En effet, ces derniers avaient des coefficients de corrélation  $r= 0,91$  (**Mendy**) et  $r= 0,83$  (**Olioso**).

La comparaison des différences de log obtenues entre la technique m2000 et celle du SYBR Green a montré que 84 % des résultats étaient concordants avec une différence  $\Delta < 0,5$  log UI/ml soit  $\Delta < 1$  log copies/ml (**A. M. Ismail et coll., 2011**). Parmi les 11 échantillons discordants (16%) obtenus, 6 avaient une charge virale élevée ( $> 5,53$  log copies/ml). Ce qui n'aurait pas d'impact réel sur l'interprétation clinique. Sur l'intervalle d'intérêt clinique, seuls 2 échantillons présentaient des discordances avec  $\Delta < 1,5$  log copies/ml.

Les discordances observées entre m2000 et la technique SYBR Green pourrait s'expliquer par la différence de sensibilité des systèmes de détection utilisés. En effet, la technique m2000 utilise des sondes qui sont connues pour leur haute spécificité par rapport aux agents intercalants. Les techniques utilisant des sondes ont démontré une bonne sensibilité et un large intervalle de quantification permettant de détecter de faibles concentrations ainsi que des concentrations très élevées (respectivement égales à 10 UI/ml et  $10^9$  UI/ml pour Abbott RealTime) (**V. Thibault, et coll., 2007**). Les techniques utilisant des agents intercalants, bien que moins sensibles sur les intervalles de quantification faibles et très élevées, couvrent largement l'intervalle d'intérêt clinique. De plus, ces techniques sont plus économiques, donc plus accessibles aux pays à ressources limitées, contrairement aux techniques commerciales de coût élevé. En effet, la technique maison du SYBR Green s'est avérée être 2 à 3 fois moins coûteuse que les techniques commerciales Taqman et m2000 avec une durée d'analyse comparable à celle du m2000 et plus courte que celle de Taqman.

En outre, dans notre étude, les amorces ciblent une région du gène codant la polymérase, zone peu variable, garantissant que le test n'est pas biaisé par les mutants de résistance médicamenteuse. De plus, dans cette région cible, le gène P ne chevauche ni avec le gène S ni avec les gènes pré-C/C; ce qui assure que les mutants du gène S et les mutants pré-C/C n'ont pas d'impact sur la quantification de l'ADN viral.

Par ailleurs, il est intéressant de définir certaines conditions expérimentales qui se sont avérées indispensables pour l'obtention d'un résultat optimal. Il s'agit tout d'abord de la

réalisation de l'extraction de l'ADN le même jour que l'amplification car, une fois congelés, les extraits d'ADN donnent des résultats moins performants.

Ensuite, la dilution de la solution mère standard doit se faire extemporanément car l'utilisation de solution standard préalablement diluée et conservée ne fournit pas de bons résultats. Enfin, une des difficultés majeures de la méthode repose sur les étapes manuelles de la procédure à savoir l'extraction, la préparation du Mix réactionnel et de la plaque PCR. Il en découle que la manipulation doit être effectuée avec précision, en utilisant des pipettes bien calibrées et en évitant toute contamination.



## CONCLUSION

Les tests de quantification de l'ADN du VHB, basés sur des techniques de biologie moléculaire sont des outils inestimables pour le suivi des patients atteints d'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 sensibles avec une limite de détection basse, inférieure à 50 copies/ml pour certaines techniques de PCR en temps réel. Les techniques de quantification aujourd'hui commercialisées ont des prix très élevés, et sont d'accès limité dans la plupart des pays d'Afrique. C'est dans cette optique que nous avons été amenés à mettre en place une technique de PCR maison, de moindre coût, pour la mesure de la charge virale VHB. Les critères de performance de cette technique ont été évalués, et les résultats de charge virale obtenus ont été comparés avec une technique de référence, m2000, dont la performance a été préalablement vérifiée par comparaison avec la technique Taqman.

Les résultats de charge virale obtenus par la technique m2000 ont été fortement corrélés à ceux donnés par la technique Taqman avec  $r = 0,987$  et un biais minime de  $-0,0105$ . Ces résultats nous ont permis de vérifier les résultats fournis par m2000.

Tout d'abord, les données de la PCR maison ont permis de conclure sur une bonne analyse des données fournies suite à l'amplification (linéarité de la courbe standard, bon coefficient ( $r^2 = 0,99$ ), une bonne efficacité de la PCR comprise en 90 et 108% (Normes : 90-110 %) et sur l'absence d'erreurs expérimentales.

Dans l'objectif d'une validation de la technique maison SYBR Green, nous avons évalué certains paramètres 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 et la comparaison avec une technique de référence (dans notre cas m2000 Abbott RealTime).

Cette évaluation a fourni des résultats favorables avec de faibles coefficients de variations  $< 5\%$ , et une incertitude montrant une faible marge d'imprécision ( $\pm 0,25$  log copies/ml soit  $\pm$

1,78 copies/ml). En outre, l'étude de la contamination a démontré qu'il n'existe pas de phénomènes de contamination inter-échantillons.

La comparaison de la technique maison avec la technique commerciale m2000 a montré un coefficient de corrélation ( $r= 0.904$ ) et un biais (-0,26) satisfaisants. Ce biais, négatif, montre une légère sous-quantification des valeurs de charge virale par la technique SYBR Green par rapport à la technique m2000. Cette sous quantification était majorée pour les charges virales supérieures à 5 log (copies/ml).

L'exploitation des données sur l'intervalle d'intérêt clinique [3,53-5,53] log copies/ml, a montré que 92 % des résultats de charge virale étaient concordants avec ceux de la technique commerciale (différence inférieure à 1,5 log copies/ml).

La méthode de PCR en temps réel utilisant la technologie du SYBR Green I s'avère satisfaisante de par son efficacité, sa répétabilité, sa reproductibilité et sa précision.

De plus, cette technique est de réalisation plus simple par rapport aux techniques utilisant des sondes de type Taqman qui nécessite un design très spécifique des sondes en fonction de la zone ciblée.

Par ailleurs, cette technique est beaucoup moins coûteuse, donc plus accessible aux pays à ressources limitées, et nécessite une durée d'analyse comparable voire plus courte que celle des techniques commerciales.

## PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

Les résultats préliminaires issus de ce travail suggèrent la nécessité de poursuivre les essais en vue d'une validation de la technique. Les principaux tests ultérieurs seraient alors:

- Une évaluation de la spécificité analytique, la sensibilité diagnostique de la technique ainsi qu'une détermination de l'intervalle de mesure, de la robustesse, de la stabilité des réactifs et des interférences. L'évaluation de ces paramètres serait indispensable pour finaliser la validation de la technique maison.
- Une évaluation de la reproductibilité sur 30 jours (selon le COFRAC)
- Une mesure du seuil de détection et du seuil de quantification de la technique.
- L'expression des résultats de la technique maison en UI/ml par l'utilisation d'un standard de l'OMS ; ceci permettra une comparaison plus précise entre les techniques et facilitera l'interprétation des résultats au clinicien.
- Une augmentation de la population d'étude afin d'améliorer la signification statistique
- Un génotypage à réaliser sur les échantillons pour lesquels la charge virale a été sous-quantifiée par rapport à la technique de référence. Ceci permettra de déterminer si les amorces utilisées sont moins spécifiques à certains génotypes.

La technique maison de charge virale pour l'hépatite B devrait être utilisée pour un meilleur suivi des patients infectés par le virus et pour prévenir les complications de l'infection chronique.

## SITES CONSULTÉS

### **Institut Pasteur :**

<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/hepatites-b-et-c> (consulté le 01/06/2013)

### **Ministère de la Santé et de l'Action sociale :**

[http://www.sante.gouv.sn/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1597:revue-de-presse-quotidienne-du-lundi-30-juillet-2012&catid=110:revue-de-presse-&Itemid=794](http://www.sante.gouv.sn/index.php?option=com_content&view=article&id=1597:revue-de-presse-quotidienne-du-lundi-30-juillet-2012&catid=110:revue-de-presse-&Itemid=794)

(Consulté le 1/06/2013)

### **Initiative Panafricaine de lutte contre les hépatites :**

<http://www.hepatitesafrique.org/index.php/pays/senegal/item/50-la-situation-desh%C3%A9patites-au-s%C3%A9n%C3%A9gal-par-le-pr-aminata-sall-diallo-point-focal-s%C3%A9n%C3%A9gal> (Consulté le 5/01/2013)

### **Programme National de Lutte contre les Hépatites (PNLH) :**

<http://www.hepatites.sn/le-pnlh/les-hepatites-au-senegal.html> (Consulté le 5/01/2013)

### **Institut de biologie et de chimie des protéines :**

[Http://Hbvdb.lbc.fr/Tmp/Dsqyhkr4gcncldvo/Ab106564\\_Entry.Txt](Http://Hbvdb.lbc.fr/Tmp/Dsqyhkr4gcncldvo/Ab106564_Entry.Txt) (Consulté le 3/02/2013)

### **Organisation mondiale de la santé :**

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/fr/index.html> (consulté le 20/01/2013)

[http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisD\\_who.cdscsr.ncs.2001\\_1.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisD_who.cdscsr.ncs.2001_1.pdf)

(Consulté le 28/05/2013)

[http://www.who.int/immunization\\_monitoring/data/SlidesGlobalImmunization.pdf](http://www.who.int/immunization_monitoring/data/SlidesGlobalImmunization.pdf)

(Consulté le 13/05/2013)

### **Comité Français d'Accréditation (COFRAC) :**

<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04> (Consulté le 17/04/2013)

[http://esilrch1.esi.umontreal.ca/~lampronp/files/intro\\_pcr.pdf](http://esilrch1.esi.umontreal.ca/~lampronp/files/intro_pcr.pdf) (Lampron, P.)

[http://frontal.univ-angers.fr/unspf/2010\\_Lille\\_Goffard\\_VHB/co/03\\_generalites.html](http://frontal.univ-angers.fr/unspf/2010_Lille_Goffard_VHB/co/03_generalites.html) (A, Goffard., 2010)

[http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires\\_desc/2011-janvier/VHB-Desc-janv2011-hezode.pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011-janvier/VHB-Desc-janv2011-hezode.pdf). (Hezode, C., 2011).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allice, T.; F. Cerutti; F. Pittaluga; S. Varetto; S. Gabella; A. Marzano; A. Franchello; G. Colucci and V. Ghisetti.** 2007. "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*, 45(3), 828-34
- Alter, H. J. and B. S. Blumberg.** 1966. "Further Studies on a "New" Human Isoprecipitin System (Australia Antigen)." *Blood*, 27(3), 297-309.
- Bahn, A.; K. Hilbert; U. Martine; J. Westedt; F. von Weizsacker and S. Wirth.** 1995. "Selection of a Precore Mutant after Vertical Transmission of Different Hepatitis B Virus Variants Is Correlated with Fulminant Hepatitis in Infants." *J Med Virol*, 47(4), 336-41.
- Bahri, O.** 2008. "Épidémiologie De L'hépatite Virale B En Tunisie " *Med Mal Infect*, 38(S2), 192.
- Bartenschlager, R. and H. Schaller.** 1988. "The Amino-Terminal Domain of the Hepadnaviral P-Gene Encodes the Terminal Protein (Genome-Linked Protein) Believed to Prime Reverse Transcription." *EMBO J*, 7(13), 4185-92.
- Bartholomeusz, A. and S. Locarnini.** 2006. "Hepatitis B Virus Mutations Associated with Antiviral Therapy." *J Med Virol*, 78 Suppl 1, S52-5.
- Beasley, R. P.** 1988. "Hepatitis B Virus. The Major Etiology of Hepatocellular Carcinoma." *Cancer*, 61(10), 1942-56.
- Beasley, R. P.; C. Trepo; C. E. Stevens and W. Szmunes.** 1977. "The E Antigen and Vertical Transmission of Hepatitis B Surface Antigen." *Am J Epidemiol*, 105(2), 94-8.
- Bekondi, C.** 2008. "Aspects Cliniques Et Épidémiologiques Des Infections À Virus De L'hépatite B En République Centrafricaine.," *Ecole doctorale "Biologie, Santé, environnement)*. Université Henri Poincaré-Nancy 1, 157.
- Benvegna, L.; G. Fattovich; F. Noventa; F. Tremolada; L. Chemello; A. Cecchetto and A. Alberti.** 1994. "Concurrent Hepatitis B and C Virus Infection and Risk of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis. A Prospective Study." *Cancer*, 74(9), 2442-8.
- Bland, J.M., Altman,D.G.** 1986. "Statistical Methods for Assessing Agreement between Two Methods of Clinical Measurement." *Lancet*, (307-310).
- Blumberg, B. S.; A. I. Sutnick and W. T. London.** 1968. "Hepatitis and Leukemia: Their Relation to Australia Antigen." *Bull N Y Acad Med*, 44(12), 1566-86.
- Brechot, C.; V. Thiers; D. Kremsdorf; B. Nalpas; S. Pol and P. Paterlini-Brechot.** 2001. "Persistent Hepatitis B Virus Infection in Subjects without Hepatitis B Surface Antigen: Clinically Significant or Purely "Occult"?" *Hepatology*, 34(1), 194-203.
- Carman, W. F.; A. R. Zanetti; P. Karayiannis; J. Waters; G. Manzillo; E. Tanzi; A. J. Zuckerman and H. C. Thomas.** 1990. "Vaccine-Induced Escape Mutant of Hepatitis B Virus." *Lancet*, 336(8711), 325-9.
- Castera, L.** 2004. "Tests De Quantification Virale Pour Le Virus De L'hépatite B " *Hépatogastro*, 11(2), 99-103.

**Charnay, P.; E. Mandart; A. Hampe; F. Fitoussi; P. Tiollais and F. Galibert.** 1979a. "Localization on the Viral Genome and Nucleotide Sequence of the Gene Coding for the Two Major Polypeptides of the Hepatitis B Surface Antigen (Hbs Ag)." *Nucleic Acids Res*, 7(2), 335-46.

**Charnay, P.; C. Pourcel; A. Louise; A. Fritsch and P. Tiollais.** 1979b. "Cloning in Escherichia Coli and Physical Structure of Hepatitis B Virion DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(5), 2222-6.

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

**Ciotti, M.; F. Marcuccilli; T. Guenci; M. G. Prignano and C. F. Perno.** 2008. "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*, 46(4), 1517-9.

**Dane, D. S.; C. H. Cameron and M. Briggs.** 1970. "Virus-Like Particles in Serum of Patients with Australia-Antigen-Associated Hepatitis." *Lancet*, 1(7649), 695-8.

**Dao, S.; F. Bougoudogo; S. Traoré; K. Coulibaly; S. Diallo and A.A Oumar.** 2009. "Portage De L'aghbs Au Mali: Bilan De Dix Ans De Dépistage À L'institut National De Recherche En Santé Publique (Inrsp)." *African journal of cancer*, 1(2), 68-71.

**Datta, S.; S. Chatterjee; V. Veer and R. Chakravarty.** 2012. "Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for Clinicians." *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 1-13.

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

**de Franchis, R.; A. Hadengue; G. Lau; D. Lavanchy; A. Lok; N. McIntyre; A. Mele; G. Paumgartner; A. Pietrangelo; J. Rodes, et al.** 2003. "Easl International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus Statement (Long Version)." *J Hepatol*, 39 Suppl 1, S3-25.

**Di Bisceglie, A. M.** 2009. "Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma." *Hepatology*, 49(5 Suppl), S56-60.

**Dickson, R. C.; J. E. Everhart; J. R. Lake; Y. Wei; E. C. Seaberg; R. H. Wiesner; R. K. Zetterman; T. L. Pruett; M. B. Ishitani and J. H. Hoofnagle.** 1997. "Transmission of Hepatitis B by Transplantation of Livers from Donors Positive for Antibody to Hepatitis B Core Antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database." *Gastroenterology*, 113(5), 1668-74.

**Dubois, F.** 1998. "Biologie Du Virus De L'hb." *Médecine thérapeutique*, Volume 4(1), 5-12.

**EASL.** 2012. "Easl Clinical Practice Guidelines: Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection." *J Hepatol*, 57(1), 167-85.

**Edmunds, W. J.; G. F. Medley; D. J. Nokes; C. J. O'Callaghan; H. C. Whittle and A. J. Hall.** 1996. "Epidemiological Patterns of Hepatitis B Virus (Hbv) in Highly Endemic Areas." *Epidemiol Infect*, 117(2), 313-25.

- Elgouhari, H. M.; T. I. Abu-Rajab Tamimi and W. D. Carey.** 2008. "Hepatitis B Virus Infection: Understanding Its Epidemiology, Course, and Diagnosis." *Cleve Clin J Med*, 75(12), 881-9.
- Fattovich, G.** 2003. "Natural History of Hepatitis B." *J Hepatol*, 39 Suppl 1, S50-8.
- Fattovich, G.; S. Boscaro; F. Noventa; E. Pornaro; D. Stenico; A. Alberti; A. Ruol and G. Realdi.** 1987. "Influence of Hepatitis Delta Virus Infection on Progression to Cirrhosis in Chronic Hepatitis Type B." *J Infect Dis*, 155(5), 931-5.
- Fattovich, G.; L. Brollo; G. Giustina; F. Noventa; P. Pontisso; A. Alberti; G. Realdi and A. Ruol.** 1991. "Natural History and Prognostic Factors for Chronic Hepatitis Type B." *Gut*, 32(3), 294-8.
- Fattovich, G.; M. Pantalena; I. Zagni; G. Realdi; S. W. Schalm; E. Christensen and Hepatitis European Concerted Action on Viral.** 2002. "Effect of Hepatitis B and C Virus Infections on the Natural History of Compensated Cirrhosis: A Cohort Study of 297 Patients." *Am J Gastroenterol*, 97(11), 2886-95.
- Fattovich, G.; T. Stroffolini; I. Zagni and F. Donato.** 2004. "Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors." *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1), S35-50.
- Franco, E.; B. Bagnato; M. G. Marino; C. Meleleo; L. Serino and L. Zaratti.** 2012. "Hepatitis B: Epidemiology and Prevention in Developing Countries." *World J Hepatol*, 4(3), 74-80.
- Friedt, M.; P. Gerner; P. Wintermeyer and S. Wirth.** 2004. "Complete Hepatitis B Virus Genome Analysis in Hbsag Positive Mothers and Their Infants with Fulminant Hepatitis B." *BMC Gastroenterol*, 4, 11.
- Galibert, F.; E. Mandart; F. Fitoussi; P. Tiollais and P. Charnay.** 1979. "Nucleotide Sequence of the Hepatitis B Virus Genome (Subtype Ayw) Cloned in E. Coli." *Nature*, 281(5733), 646-50.
- Ghosh, S.; P. Banerjee; P. Deny; R. K. Mondal; M. Nandi; A. Roychoudhury; K. Das; S. Banerjee; A. Santra; F. Zoulim, et al.** 2013. "New Hbv Subgenotype D9, a Novel D/C Recombinant, Identified in Patients with Chronic Hbeag-Negative Infection in Eastern India." *J Viral Hepat*, 20(3), 209-18.
- Gust, I. D.; C. J. Burrell; A. G. Coulepis; W. S. Robinson and A. J. Zuckerman.** 1986. "Taxonomic Classification of Human Hepatitis B Virus." *Intervirology*, 25(1), 14-29.
- Hézode, C.** 2011. "Actualités Hépatite Chronique B." *Hôpital Henri Mondor -Créteil*, [http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires\\_desc/2011-janvier/VHB-Desc-janv2011-hezode.pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011-janvier/VHB-Desc-janv2011-hezode.pdf)
- Hochberger, S.; D. Althof; R. Gallegos de Schrott; N. Nachbaur; H. Rock and H. Leying.** 2006. "Fully Automated Quantitation of Hepatitis B Virus (Hbv) DNA in Human Plasma by the Cobas Ampliprep/Cobas Taqman System." *J Clin Virol*, 35(4), 373-80.
- Hoofnagle, J. H.** 1981. "Serologic Markers of Hepatitis B Virus Infection." *Annu Rev Med*, 32, 1-11.
- Hsu, Y. S.; R. N. Chien; C. T. Yeh; I. S. Sheen; H. Y. Chiou; C. M. Chu and Y. F. Liaw.** 2002. "Long-Term Outcome after Spontaneous Hbeag Seroconversion in Patients with Chronic Hepatitis B." *Hepatology*, 35(6), 1522-7.

- Huang, J. and T. J. Liang.** 1993. "A Novel Hepatitis B Virus (Hbv) Genetic Element with Rev Response Element-Like Properties That Is Essential for Expression of Hbv Gene Products." *Mol Cell Biol*, 13(12), 7476-86.
- Huang, Y. T.; C. L. Jen; H. I. Yang; M. H. Lee; J. Su; S. N. Lu; U. H. Iloeje and C. J. Chen.** 2011. "Lifetime Risk and Sex Difference of Hepatocellular Carcinoma among Patients with Chronic Hepatitis B and C." *J Clin Oncol*, 29(27), 3643-50.
- Hwang, G. Y.; C. Y. Lin; L. M. Huang; Y. H. Wang; J. C. Wang; C. T. Hsu; S. S. Yang and C. C. Wu.** 2003. "Detection of the Hepatitis B Virus X Protein (Hbx) Antigen and Anti-Hbx Antibodies in Cases of Human Hepatocellular Carcinoma." *J Clin Microbiol*, 41(12), 5598-603.
- Iloeje, U. H.; H. I. Yang; J. Su; C. L. Jen; S. L. You; C. J. Chen; Elevation Risk Evaluation of Viral Load and H. B. V. Study Group Associated Liver Disease/Cancer-In.** 2006. "Predicting Cirrhosis Risk Based on the Level of Circulating Hepatitis B Viral Load." *Gastroenterology*, 130(3), 678-86.
- Ismail, A. M., Sivakumar, J. Anantharam, R. Dayalan, S. Samuel, P. Fletcher, G. J. Gnanamony, M. Abraham,P.** 2011. "Performance Characteristics and Comparison of Abbott and Artus Real-Time Systems for Hepatitis B Virus DNA Quantification." *J Clin Microbiol*, 49(9), 3215-21.
- Jack, A. D.; A. J. Hall; N. Maine; M. Mendy and H. C. Whittle.** 1999. "What Level of Hepatitis B Antibody Is Protective?" *J Infect Dis*, 179(2), 489-92.
- Karayiannis, P.; D. M. Novick; A. S. Lok; M. J. Fowler; J. Monjardino and H. C. Thomas.** 1985. "Hepatitis B Virus DNA in Saliva, Urine, and Seminal Fluid of Carriers of Hepatitis B E Antigen." *Br Med J (Clin Res Ed)*, 290(6485), 1853-5.
- Kay, A.; E. Mandart; C. Trepo and F. Galibert.** 1985. "The Hbv Hbx Gene Expressed in E. Coli Is Recognised by Sera from Hepatitis Patients." *EMBO J*, 4(5), 1287-92.
- Kay, A. and F. Zoulim.** 2007. "Hepatitis B Virus Genetic Variability and Evolution." *Virus Res*, 127(2), 164-76.
- Kekule, A. S.; U. Lauer; L. Weiss; B. Lubber and P. H. Hofschneider.** 1993. "Hepatitis B Virus Transactivator Hbx Uses a Tumour Promoter Signalling Pathway." *Nature*, 361(6414), 742-5.
- Kew, M. C.** 2010. "Epidemiology of Chronic Hepatitis B Virus Infection, Hepatocellular Carcinoma, and Hepatitis B Virus-Induced Hepatocellular Carcinoma." *Pathol Biol (Paris)*, 58(4), 273-7.
- Kidd-Ljunggren, K.; Y. Miyakawa and A. H. Kidd.** 2002. "Genetic Variability in Hepatitis B Viruses." *J Gen Virol*, 83(Pt 6), 1267-80.
- Kim, B. K.; P. A. Revill and S. H. Ahn.** 2011. "Hbv Genotypes: Relevance to Natural History, Pathogenesis and Treatment of Chronic Hepatitis B." *Antivir Ther*, 16(8), 1169-86.
- Kim, C. M.; K. Koike; I. Saito; T. Miyamura and G. Jay.** 1991. "Hbx Gene of Hepatitis B Virus Induces Liver Cancer in Transgenic Mice." *Nature*, 351(6324), 317-20.
- Klingmuller, U. and H. Schaller.** 1993. "Hepadnavirus Infection Requires Interaction between the Viral Pre-S Domain and a Specific Hepatocellular Receptor." *J Virol*, 67, 7414-22.



- Köck, J. and H.J Schlicht.** 1993. "Analysis of the Earliest Steps of Hepadnavirus Replication: Genome Repair after Infectious Entry into Hepatocytes Does Not Depend on Viral Polymerase Activity." *J Virol*, 67(8), 4867-74.
- Koike, K.; K. Moriya; S. Iino; H. Yotsuyanagi; Y. Endo; T. Miyamura and K. Kurokawa.** 1994. "High-Level Expression of Hepatitis B Virus Hbx Gene and Hepatocarcinogenesis in Transgenic Mice." *Hepatology*, 19(4), 810-9.
- Komatsu, H.; A. Inui; T. Sogo; A. Tateno; R. Shimokawa and T. Fujisawa.** 2012. "Tears from Children with Chronic Hepatitis B Virus (Hbv) Infection Are Infectious Vehicles of Hbv Transmission: Experimental Transmission of Hbv by Tears, Using Mice with Chimeric Human Livers." *J Infect Dis*, 206(4), 478-85.
- Krajden, M.; G. McNabb and M. Petric.** 2005. "The Laboratory Diagnosis of Hepatitis B Virus." *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 16(2), 65-72.
- Kramvis, A. and M. C. Kew.** 1999. "The Core Promoter of Hepatitis B Virus." *J Viral Hepat*, 6(6), 415-27.
- Kramvis, A. and M. C. Kew.** 2007. "Epidemiology of Hepatitis B Virus in Africa, Its Genotypes and Clinical Associations of Genotypes." *Hepato Res*, 37(s1), S9-S19.
- Kuniholm, M. H.; O. A. Lesi; M. Mendy; A. O. Akano; O. Sam; A. J. Hall; H. Whittle; E. Bah; J. J. Goedert; P. Hainaut, et al.** 2008. "Aflatoxin Exposure and Viral Hepatitis in the Etiology of Liver Cirrhosis in the Gambia, West Africa." *Environ Health Perspect*, 116(11), 1553-7.
- Lavanchy, D.** 2008. "Chronic Viral Hepatitis as a Public Health Issue in the World " *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.*, 22(6), 991-1008.
- Lee, G. H.; S. Wasser and S. G. Lim.** 2008. "Hepatitis B Pregenomic Rna Splicing--the Products, the Regulatory Mechanisms and Its Biological Significance." *Virus Res*, 136(1-2), 1-7.
- Leuridan, E. and P. Van Damme.** 2011. "Hepatitis B and the Need for a Booster Dose." *Clin Infect Dis*, 53(1), 68-75.
- Liaw, Y. F. and C. M. Chu.** 2009. "Hepatitis B Virus Infection." *Lancet*, 373(9663), 582-92.
- Liu, C. J.; P. J. Chen; M. Y. Lai; F. Y. Lin; T. Wang; J. H. Kao and D. S. Chen.** 2006. "Viral Factors Correlate with Hepatitis B E Antigen Seroconversion in Patients with Chronic Hepatitis B." *Liver Int*, 26(8), 949-55.
- Locarnini, S.; A. Hatzakis; J. Heathcote; E. B. Keeffe; T. J. Liang; D. Mutimer; J. M. Pawlotsky and F. Zoulim.** 2004. "Management of Antiviral Resistance in Patients with Chronic Hepatitis B." *Antivir Ther*, 9(5), 679-93.
- Lok, A. S.** 2007. "Navigating the Maze of Hepatitis B Treatments." *Gastroenterology*, 132(4), 1586-94.
- Louisirirotchanakul, S.; C. Kanoksinsombat; A. Theamboonlert; P. Puthavatana; C. Wasi and Y. Poovorawan.** 2004. "Mutation of the "a" Determinant of Hbsag with Discordant Hbsag Diagnostic Kits." *Viral Immunol*, 17(3), 440-4.

- Mahoney, F. J.** 1999. "Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection." *Clin Microbiol Rev*, 12(2), 351-66.
- Mansour, W.; F. Z. Malick; A. Sidiya; E. Ishagh; M. A. Chekaraou; P. Veillon; A. Ducancelle; S. Brichler; F. Le Gal; B. Lo, et al.** 2012. "Prevalence, Risk Factors, and Molecular Epidemiology of Hepatitis B and Hepatitis Delta Virus in Pregnant Women and in Patients in Mauritania." *J Med Virol*, 84(8), 1186-98.
- Martinson, F. E.; K. A. Weigle; R. A. Royce; D. J. Weber; C. M. Suchindran and S. M. Lemon.** 1998. "Risk Factors for Horizontal Transmission of Hepatitis B Virus in a Rural District in Ghana." *Am J Epidemiol*, 147(5), 478-87.
- Mast, E. E.; H. S. Margolis; A. E. Fiore; E. W. Brink; S. T. Goldstein; S. A. Wang; L. A. Moyer; B. P. Bell; M. J. Alter and Practices Advisory Committee on Immunization.** 2005. "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*, 54(RR-16), 1-31.
- Maupas, P.; J. P. Chiron; F. Barin; P. Coursaget; A. Goudeau; J. Perrin; F. Denis and I. D. Mar.** 1981. "Efficacy of Hepatitis B Vaccine in Prevention of Early Hbsag Carrier State in Children. Controlled Trial in an Endemic Area (Senegal)." *Lancet*, 1(8215), 289-92.
- Maupas, P.; A. Goudeau; P. Coursaget; J. Drucker and P. Bagros.** 1976. "Immunisation against Hepatitis B in Man." *Lancet*, 1(7974), 1367-70.
- Mauss, S. ; T. Berg; J. Rockstroh; C. Sarrazin and H. Wedemeyer.** 2012. "Hepatology-a Clinical Textbook," Flying Publisher 546.
- Mendy, M. E.; S. Kaye; M. van der Sande; P. Rayco-Solon; P. A. Waight; D. Shipton; D. Awi; P. Snell; H. Whittle and S. J. McConkey.** 2006. "Application of Real-Time Pcr to Quantify Hepatitis B Virus DNA in Chronic Carriers in the Gambia." *Virology*, 3, 23.
- Nakatake, H.; O. Chisaka; S. Yamamoto; K. Matsubara and R. Koshy.** 1993. "Effect of X Protein on Transactivation of Hepatitis B Virus Promoters and on Viral Replication." *Virology*, 195(2), 305-14.
- Natov, S. N. and B. J. Pereira.** 2002. "Transmission of Viral Hepatitis by Kidney Transplantation: Donor Evaluation and Transplant Policies (Part 1: Hepatitis B Virus)." *Transpl Infect Dis*, 4(3), 117-23.
- Nowak, M. A.; S. Bonhoeffer; A. M. Hill; R. Boehme; H. C. Thomas and H. McDade.** 1996. "Viral Dynamics in Hepatitis B Virus Infection." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9), 4398-402.
- Okamoto, H.; M. Imai; M. Kametani; T. Nakamura and M. Mayumi.** 1987. "Genomic Heterogeneity of Hepatitis B Virus in a 54-Year-Old Woman Who Contracted the Infection through Materno-Fetal Transmission." *The Japanese journal of experimental medicine*, 57(4)(4), 231-6.
- Oliosio, D.; M. Boaretti; M. Ligozzi; G. Lo Cascio and R. Fontana.** 2007. "Detection and Quantification of Hepatitis B Virus DNA by Sybr Green Real-Time Polymerase Chain Reaction." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26(1), 43-50.
- OMS.** 2012. "Hépatite B." *Aide-mémoire N°204*.

- Oon, C. J.; G. K. Lim; Z. Ye; K. T. Goh; K. L. Tan; S. L. Yo; E. Hopes; T. J. Harrison and A. J. Zuckerman.** 1995. "Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus Vaccine Variants in Singapore." *Vaccine*, 13(8), 699-702.
- Pasteur, Institut.** 2013. "Les Hépatites Virales ".
- Patient, R.** 2008. "Morphogénèse Du Virus De L'hépatite B " *Virologie*, 12(6), 453-64.
- Pawlotsky, J. M.** 2002. "Molecular Diagnosis of Viral Hepatitis." *Gastroenterology*, 122(6), 1554-68.
- Payen, J. L. and M. Rongieres.** 2002. "[History of Hepatitis.2. Identification of Epidemic Hepatitis]." *Rev Prat*, 52(20), 2213-7.
- Perrillo, R. P.; E. R. Schiff; G. L. Davis; H. C. Bodenheimer, Jr.; K. Lindsay; J. Payne; J. L. Dienstag; C. O'Brien; C. Tamburro; I. M. Jacobson, et al.** 1990. "A Randomized, Controlled Trial of Interferon Alfa-2b Alone and after Prednisone Withdrawal for the Treatment of Chronic Hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group." *N Engl J Med*, 323(5), 295-301.
- Perz, J. F.; G. L. Armstrong; L. A. Farrington; Y. J. Hutin and B. P. Bell.** 2006. "The Contributions of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infections to Cirrhosis and Primary Liver Cancer Worldwide." *J Hepatol*, 45(4), 529-38.
- Petit, M. A.; F. Capel; S. Dubanchet and H. Mabit.** 1992. "Pres1-Specific Binding Proteins as Potential Receptors for Hepatitis B Virus in Human Hepatocytes." *Virology*, 187(1), 211-22.
- Poitras, E. and A. Houde.** 2002. "La Pcr En Temps Réel: Principes Et Applications." *Reviews in Biology and Biotechnology. By The Moroccan Society of Biology in Canada*, 2(2), 2-11.
- Pontisso, P.; G. Morsica; M. G. Ruvoletto; R. Zambello; C. Colletta; L. Chemello and A. Alberti.** 1991. "Hepatitis B Virus Binds to Peripheral Blood Mononuclear Cells Via the Pre S1 Protein." *J Hepatol*, 12(2), 203-6.
- Previsani, N. , Lavanchy, D.** 2001. "Hepatitis Delta", OMS
- Pyne, M. T.; L. Vest; J. Clement; J. Lee; J. R. Rosvall; K. Luk; M. Rossi; B. Cobb and D. R. Hillyard.** 2012. "Comparison of Three Roche Hepatitis B Virus Viral Load Assay Formats." *J Clin Microbiol*, 50(7), 2337-42.
- Radziwill, G.; W. Tucker and H. Schaller.** 1990. "Mutational Analysis of the Hepatitis B Virus P Gene Product: Domain Structure and Rnase H Activity." *J Virol*, 64(2), 613-20.
- Raimondo, G.; T. Pollicino; L. Romano and A. R. Zanetti.** 2010. "A 2010 Update on Occult Hepatitis B Infection." *Pathol Biol (Paris)*, 58(4), 254-7.
- Robinson, W. S.; D. A. Clayton and R. L. Greenman.** 1974. "DNA of a Human Hepatitis B Virus Candidate." *J Virol*, 14(2), 384-91.
- Saldanha, J.; W. Gerlich; N. Lelie; P. Dawson; K. Heermann; A. Heath and W. H. O. Collaborative Study Group.** 2001. "An International Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis B Virus DNA Nucleic Acid Amplification Techniques." *Vox Sang*, 80(1), 63-71.

- Sall Diallo, A.; M. Sarr; Y. Fall; C. Diagne and M. O. Kane.** 2004. "[Hepatitis B Infection in Infantile Population of Senegal]." *Dakar Med*, 49(2), 136-42.
- Servant-Delmas, M.; A. Mercier; A. Girault and S. Laperche.** 2007. "Impact Clinique, Thérapeutique Et Diagnostique De La Diversité Génétique Du Virus De L'hépatite B." *Virologie*, 11(4), 297-307.
- Shi, W.; Z. Zhang; C. Ling; W. Zheng; C. Zhu; M. J. Carr and D. G. Higgins.** 2013. "Hepatitis B Virus Subgenotyping: History, Effects of Recombination, Misclassifications, and Corrections." *Infect Genet Evol.*
- Sitterlin, D.; P. Tiollais and C. Transy.** 2000. "Le Rôle De La Protéine Virale X Dans Le Cycle Infectieux Des Hépadnavirus De Mammifères." *Virologie*, 4(3), 217-27.
- Spandau, D. F. and C. H. Lee.** 1988. "Trans-Activation of Viral Enhancers by the Hepatitis B Virus X Protein." *J Virol*, 62(2), 427-34.
- Standring, D. N.; J. H. Ou; F. R. Masiarz and W. J. Rutter.** 1988. "A Signal Peptide Encoded within the Precore Region of Hepatitis B Virus Directs the Secretion of a Heterogeneous Population of E Antigens in *Xenopus* Oocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(22), 8405-9.
- Stanislas, P.** . 2007. "Épidémiologie Et Histoire Naturelle De L'infection Par Le Virus De L'hépatite B." *Hépatogastro*, 14.
- Summers, J.; A. O'Connell and I. Millman.** 1975. "Genome of Hepatitis B Virus: Restriction Enzyme Cleavage and Structure of DNA Extracted from Dane Particles." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(11), 4597-601.
- Tang, B.; W. D. Kruger; G. Chen; F. Shen; W. Y. Lin; S. Mboup; W. T. London and A. A. Evans.** 2004. "Hepatitis B Viremia Is Associated with Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Carriers." *J Med Virol*, 72(1), 35-40.
- Tatematsu, K.; Y. Tanaka; F. Kurbanov; F. Suguchi; S. Mano; T. Maeshiro; T. Nakayoshi; M. Wakuta; Y. Miyakawa and M. Mizokami.** 2009. "A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J." *J Virol*, 83(20), 10538-47.
- Thibault, V.; C. Pichoud; C. Mullen; J. Rhoads; J. B. Smith; A. Bitbol; S. Thamm and F. Zoulim.** 2007. "Characterization of a New Sensitive Pcr Assay for Quantification of Viral DNA Isolated from Patients with Hepatitis B Virus Infections." *J Clin Microbiol*, 45(12), 3948-53.
- Tiollais, P.; P. Charnay and G. N. Vyas.** 1981. "Biology of Hepatitis B Virus." *Science*, 213(4506), 406-11.
- Tipples, G. A.; M. M. Ma; K. P. Fischer; V. G. Bain; N. M. Kneteman and D. L. Tyrrell.** 1996. "Mutation in Hbv Rna-Dependent DNA Polymerase Confers Resistance to Lamivudine in Vivo." *Hepatology*, 24(3), 714-7.
- Tran, T. T.; T. N. Trinh and K. Abe.** 2008. "New Complex Recombinant Genotype of Hepatitis B Virus Identified in Vietnam." *J Virol*, 82(11), 5657-63.
- Tse, C. and J. Capeau.** 2003. "[Real Time Pcr Methodology for Quantification of Nucleic Acids]." *Ann Biol Clin (Paris)*, 61(3), 279-93.

- Tseng, T. C.; C. J. Liu; H. C. Yang; T. H. Su; C. C. Wang; C. L. Chen; S. F. Kuo; C. H. Liu; P. J. Chen; D. S. Chen, et al.** 2012. "High Levels of Hepatitis B Surface Antigen Increase Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Low Hbv Load." *Gastroenterology*, 142(5), 1140-49 e3; quiz e13-4.
- Tur-Kaspa, R.; R. D. Burk; Y. Shaul and D. A. Shafritz.** 1986. "Hepatitis B Virus DNA Contains a Glucocorticoid-Responsive Element." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(6), 1627-31.
- Urban, S.; A. Schulze; M. Dandri and J. Petersen.** 2010 "The Replication Cycle of Hepatitis B Virus." *J Hepatol*, 52, 282-84.
- van der Eijk, A. A.; H. G. Niesters; B. E. Hansen; R. A. Heijtkink; H. L. Janssen; S. W. Schalm and R. A. de Man.** 2006. "Quantitative Hbv DNA Levels as an Early Predictor of Nonresponse in Chronic Hbe-Antigen Positive Hepatitis B Patients Treated with Interferon-Alpha." *J Viral Hepat*, 13(2), 96-103.
- van der Eijk, A. A.; H. G. Niesters; B. E. Hansen; S. D. Pas; J. H. Richardus; M. Mostert; H. L. Janssen; S. W. Schalm and R. A. de Man.** 2005. "Paired, Quantitative Measurements of Hepatitis B Virus DNA in Saliva, Urine and Serum of Chronic Hepatitis B Patients." *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 17(11), 1173-9.
- Verslype, C.; O. Rosmorduc; P. Rougier and Esmo Guidelines Working Group.** 2012. "Hepatocellular Carcinoma: Esmo-Esdo Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Ann Oncol*, 23 Suppl 7, vii41-8.
- Vray, M.; J. M. Debonne; J. M. Sire; N. Tran; B. Chevalier; J. C. Plantier; F. Fall; G. Vernet; F. Simon and P. S. Mb.** 2006. "Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus in Dakar, Senegal." *J Med Virol*, 78(3), 329-34.
- Wang, G. H.; F. Zoulim; E. H. Leber; J. Kitson and C. Seeger.** 1994. "Role of Rna in Enzymatic Activity of the Reverse Transcriptase of Hepatitis B Viruses." *J Virol*, 68(12), 8437-42.
- Wasley, A.; S. Grytdal and K. Gallagher.** 2008. "Surveillance for Acute Viral Hepatitis-United States, 2006." *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance Summaries*, 57(2), 1-24.
- West, D. J. and G. B. Calandra.** 1996. "Vaccine Induced Immunologic Memory for Hepatitis B Surface Antigen: Implications for Policy on Booster Vaccination." *Vaccine*, 14(11), 1019-27.
- Yamaura, T.; E. Tanaka; A. Matsumoto; A. Rokuhara; K. Orii; K. Yoshizawa; Y. Miyakawa and K. Kiyosawa.** 2003. "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*, 70(4), 545-52.
- Yuen, M. F.; E. Sablon; C. K. Hui; H. J. Yuan; H. Decraemer and C. L. Lai.** 2001. "Factors Associated with Hepatitis B Virus DNA Breakthrough in Patients Receiving Prolonged Lamivudine Therapy." *Hepatology*, 34(4 Pt 1), 785-91.
- Yuen, M. F.; H. J. Yuan; D. K. Wong; J. C. Yuen; W. M. Wong; A. O. Chan; B. C. Wong; K. C. Lai and C. L. Lai.** 2005. "Prognostic Determinants for Chronic Hepatitis B in Asians: Therapeutic Implications." *Gut*, 54(11), 1610-4.
- Zoulim, F.** 2004. "Hépatite B : La Problématique De L'adn Super Enroulé." *La Lettre de l'Hépatogastroentérologie*, N°1, 47-48.

**Zoulim, F. and Trépo C.** 1997. "Virus De L'hépatite B : Réplication Et Mécanismes D'action Des Antiviraux " *Virologie-Revues*, 1(numéro 3), 197-215.

# ANNEXES

## Annexe 1: Score METAVIR

Le virus va entraîner une réaction inflammatoire plus ou moins importante dans le tissu hépatique, qui va aboutir à la formation d'une fibrose. Cette dernière est caractérisée par l'accumulation excessive de collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire, dans le parenchyme hépatique. Elle aboutit progressivement à la destruction de l'architecture tissulaire normale où le tissu hépatique est progressivement remplacé par du tissu fibreux. L'évaluation de l'activité cellulaire et de la fibrose se fait au moyen du score histologique appelé le score METAVIR.

<b>Score A (activité)</b>	
- Absente	A0
- Minimale	A1
- Modérée	A2
- Sévère	A3
<b>Score F (fibrose)</b>	
- Absence de fibrose	F0
- Fibrose portale stellaire sans septa	F1
- Fibrose portale avec rares septa	F2
- Nombreux septa sans cirrhose	F3
- Cirrhose	F4

# **Annexe 2: 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

## **2 Réactifs**

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



## Annexe 3: Matériel et réactifs spécifiques au m2000

### 1 Matériel

- Aliquots de plasma d'un volume minimal de 620µl
- Gants sans talc
- Embouts stériles à filtre p200 et p1000
- Micropipettes de 20-200µl et 100-1000µl
- Master mix tube spécifique de m2000sp
- Reagent vessel spécifique de m2000sp
- Deep Well Plates spécifique de m2000sp
- Embouts de 200 µL spécifique de m2000sp
- Embouts de 1 mL spécifique de m2000sp
- Microplaque de 96 puits pour PCR
- Film adhésif
- Agitateur de type vortex
- Centrifugeuse avec rotor adaptable pour tube 1,5 ml
- Instrument m2000sp (Abbott).
- Appareil de PCR en temps réel ABI 7500 (Abbott m2000rt).

### 2 Réactifs

#### ➤ **Abbott Real Time HBV Sample Preparation Kit :**

- Tampon de lyse
- Protéinase K
- Solution de microparticules (silice magnétique)
- Tampons de lavage 1 et 2
- Tampon d'élution

#### ➤ **Abbott Real Time HBV Amplification Reagent Kit**

- 1 flacon d'enzymes Amplitaq Gold dans une solution tampon avec stabilisants
- 1 flacon de réactifs d'oligonucléotides de VHB. Moins de 0.1% d'oligonucléotides synthétiques (4 amorces et 3 sondes) et moins de 0.2% de dNTPs dans une solution tampon avec un fluorochrome de référence.
- 1 flacon de réactif d'activation. 38mM de chlorure de magnésium dans une solution tampon.

#### ➤ **Abbott Real Time HBV Control Kit**

- Contrôle positif fort
- Contrôle positif faible

- Contrôle négatif
- **Abbott RealTime HBV Calibrator Kit**
  - Calibrateurs A et B

## Annexe 4: Mode opératoire de la technique m2000

Avant le début de chaque manipulation, une maintenance quotidienne de l'appareil doit être réalisée comme indiqué dans le manuel technique Abbott m2000.

Un maximum de 48 échantillons peut être traité par série et chaque série comporte un contrôle positif fort, un contrôle positif faible et un contrôle négatif. La première analyse réalisée comportera en plus les calibrateurs (trois calibrateurs A et trois calibrateurs B) qui vont permettre d'obtenir la droite standard (droite de calibration).

Les échantillons à analyser sont, soit du sérum humain, soit du plasma sanguin prélevé uniquement sur tube EDTA (l'utilisation d'autres anticoagulants n'a pas été validée).

Les prélèvements à analyser sont décongelés, de même que les calibrateurs, les contrôles externes et le contrôle interne.

Un volume de 500 µl de plasma ou de sérum est mis dans les tubes réactionnels placés dans les portoirs d'échantillons. L'ordre des échantillons doit être bien défini pour éviter les erreurs sur les numéros d'échantillon. Les trois contrôles externes, et si besoin, les six calibrateurs, sont également placés sur le rack des échantillons.

Les réactifs d'extraction utilisés sont : la solution de lyse qui va assurer la lyse des particules virales, la protéinase K qui permet de digérer les protéines accrochées à l'ADN, la solution de microparticules magnétiques d'oxyde de fer pour la capture de l'ADN viral, les tampons de lavage 1 et 2 qui permettent l'élimination de tout composant non lié, et enfin le tampon d'élution pour recueillir les acides nucléiques purifiés.

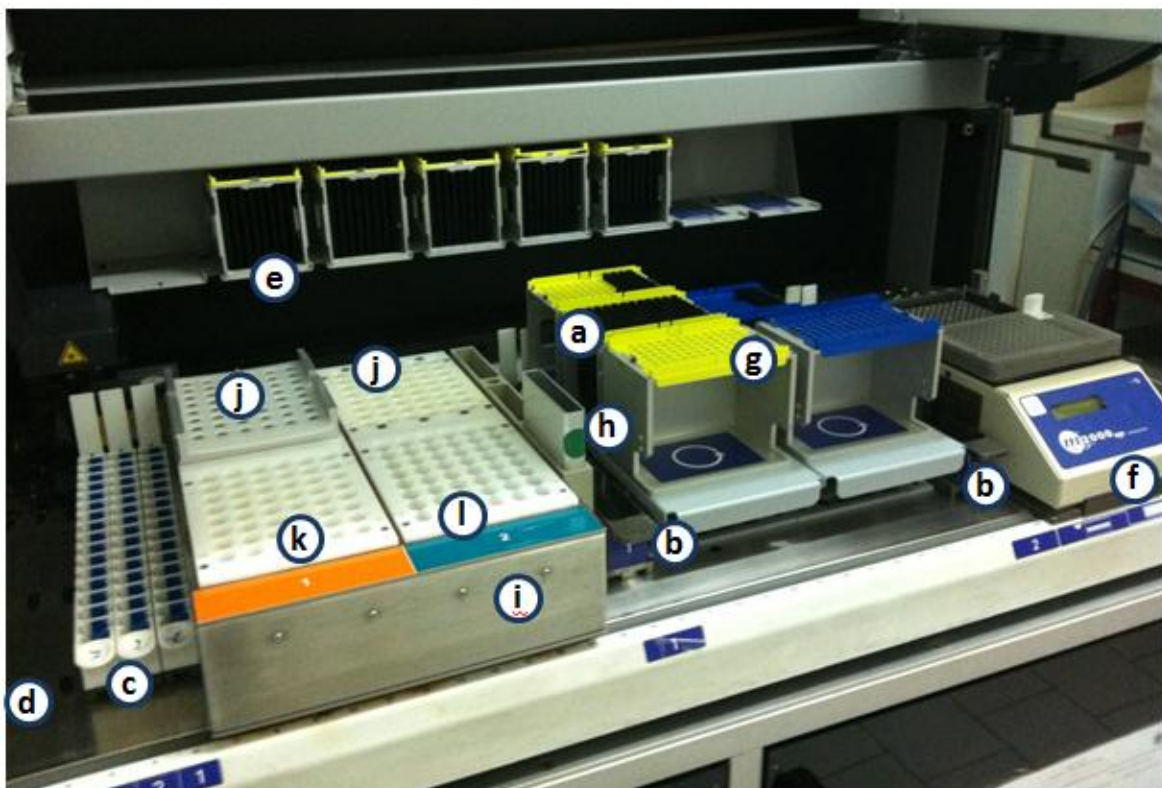
Un volume de 100 µl microlitres du CI sont ajoutés dans le tampon de lyse. La protéinase K est reconstituée en ajoutant 2,45 ml de protéinase K dans 17,15 ml d'eau milliQ ou ultra pure. Le tampon de lavage 2 est préparé en y ajoutant 70 ml d'éthanol absolu.

Ces réactifs d'extraction sont mis dans les cuves étiquetées avec les codes-barres ; les cuves sont alors posées sur leurs portoirs qui seront placés à leurs positions correspondantes dans l'appareil. Les portoirs d'échantillons sont également placés à leurs places spécifiques dans le système m2000sp. De plus, les cupules réactionnelles sont placées sur le portoir de l'unité de traitement 1ml. Cette unité possède quatre zones : la zone de température ambiante, la zone magnétique et deux zones de chauffage (50° et 75°). Au début de l'étape d'extraction, le portoir de l'unité de traitement 1ml est placé dans la zone de chauffage (à 50°C).

Deux plaques de 96 puits profonds sont placées : l'une à la position de réutilisation des cônes, et l'autre pour la récupération des extraits purs d'ADN.

Des portoirs de cônes de 1000 µl et de 200 µl doivent être placés sur la plate-forme de travail et sur les étagères pour les réserves (la position 1 doit rester vide).

Après l'étape d'extraction, une procédure d'addition du master mix aux extraits d'ADN est réalisée. Pour cela il faut placer le coffret des réactifs d'amplification (réactif d'activation, oligonucléotides et ADN polymérase), le tube master mix, ainsi que la plaque optique de 96 puits à leurs places respectives sur la plate-forme de travail (Figure 36).



**Figure 36: Organisation du plan de travail**

a : Portoir DiTi, b : portoirs de cuves de réactifs, c : Portoirs échantillons, d : Taquets de positionnement, e : Etagère de rangement des embouts à usage unique de 1000 µl, f : plateforme de déchargement des extraits, g : portoir DiTi à réutiliser, h : station de déchets, i : unité de traitement 1 ml, j : zones de chauffage, k : zone de température ambiante, l : zone magnétique

A la fin de la procédure, la plaque est scellée par le couvercle adhésif optique Abbott et est placée dans le système m2000rt pour l'amplification et la détection de l'ADN cible par fluorescence.

# Annexe 5: Matériel et réactifs spécifiques à la technique maison de PCR

## 1 Matériel

- Prélèvements de plasma d'un volume minimal de 200µl
- Jeux de micropipettes p1000, p200, p20, p10
- Embouts stériles à filtres p-1000, p-200, p-20, p-10
- Gants sans talc
- Microtubes Eppendorf de 1.5 ou 2 ml
- Agitateur de type vortex
- Micro centrifugeuse pour tubes de 1.5 à 2 ml
- Incubateur à 56°C
- Hotte à flux laminaire
- Microplaque de 96 puits pour PCR
- Couvercle adhésif optique
- Centrifugeuse de plaques
- Appareil de PCR en temps réel ABI 7300

## 2 Réactifs

- QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250) pour l'extraction
- Eau RNase-DNase free
- Ethanol 96-100%
- Eau savonnée
- Eau de Javel dilué à 10%
- Amorces sens et anti-sens du VHB
- SuperMix Sybr Green INVITROGEN (contenant enzyme, dNTPs (dUTP), Uracyl DNA Glycosylase (UDG)).
- Solution mère de plasmide PtriEx 1.1HBV/D, pour la gamme étalon (préparé à U1052, Lyon), concentré à  $7,5 \cdot 10^9$  copies/5µL

## Annexe 6: Représentation du plasmide utilisé dans la gamme standard de la PCR maison.

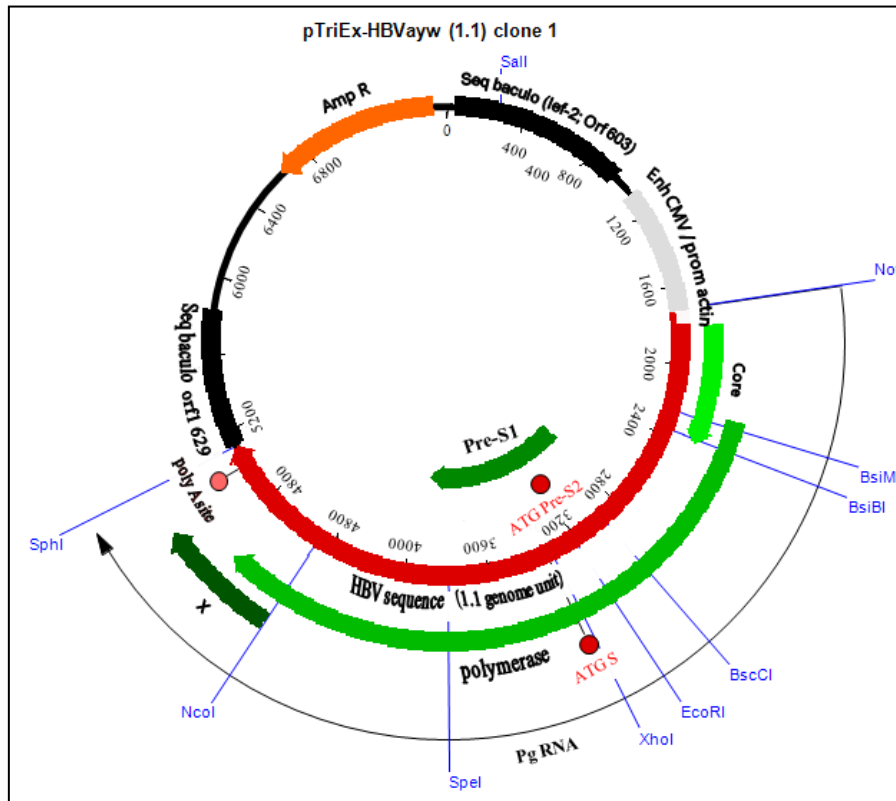


Figure 37 : Plasmide utilisé pour la gamme standard de la technique maison  
(INSERM Lyon)

## Annexe 7: Protocole d'extraction de l'ADN du VHB par la technique QIAGEN

### ➤ Préparation des réactifs

- **Préparation de la solution de la Protéase**

Rajouter 5,5 ml de solvant de protéase dans le flacon contenant la protéase lyophilisée. La solution reconstituée est conservée entre 2-8°C et est stable environ 2 mois

- **Préparation du tampon AW1**

Le tampon AW1 est fourni sous forme de concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter un volume de 125 ml d'éthanol 96-100%.

- **Préparation du tampon AW2**

Le tampon AW2 est fourni sous forme de concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter un volume de 160 ml d'éthanol 96-100%.

### ➤ Extraction proprement dite

*Travailler sous la hotte pour l'étape de lyse*

**Remarque :** les déchets contaminés par le plasma sont jetés dans un bac contenant de l'eau de javel diluée à 10%, alors que les déchets contaminés par les réactifs d'extraction seront jetés dans un bac contenant de l'eau savonnée.

- 1- Préparer des microtubes de 1.5 à 2 ml en marquant le numéro des échantillons
- 2- Prélever 200µl de plasma(EDTA)/sérum dans chacun des microtubes correspondant
- 3- Rajouter 200µl de tampon de lyse (Buffer AL) dans chaque tube
- 4- Additionner 20 µl de solution de protéase QIAGEN et vortexer pendant 15 secondes.

ATTENTION : NE PAS AJOUTER DIRECTEMENT LA PROTEASE QIAGEN OU PROTEINASE K DANS LE TAMPON DE LYSE

- 5- Incuber à 56°C (dans l'incubateur) pendant 10 min

*Continuer sous la hotte ou travailler sur la paillasse*

- 6- Pendant ce temps, préparer des colonnes QIAamp annotées avec le numéro des échantillons
- 7- Après les 10 mn d'incubation, Centrifuger brièvement les tubes, à 25°C, pour faire descendre le liquide.
- 8- Additionner dans chaque tube 200µl d'éthanol absolu (96-100%), afin de précipiter l'ADN.

9- Vortexer pendant 15 secondes puis Centrifuger brièvement les tubes

Transférer le contenu de chaque tube dans la colonne QIAamp correspondante en pipetant 650µl du lysat cellulaire

10- S'assurer que les colonnes sont bien fermées et centrifuger les tubes à 8000 tours/min pendant 1 min

11- Jeter le filtrat dans le bac contenant l'eau savonnée, jeter le tube collecteur et replacer la colonne QIAamp dans un autre tube collecteur.

12- Ouvrir la colonne et rajouter 500 µl de Tampon de lavage (buffer AW1)

Fermer le tube et centrifuger à 8000 tours/min pendant 1 min ; Jeter le filtrat puis replacer la colonne QIAamp dans un autre tube collecteur

13- Ouvrir la colonne QIAamp et ajouter 500µl de tampon de lavage (buffer AW2) ;

14- Fermer le tube et centrifuger à 14000 tours/min pendant 3 min ; Jeter le filtrat puis replacer la colonne QIAamp dans autre tube collecteur

15- Réaliser une centrifugation à vide à 14000 tours/min pendant 1 min pour s'assurer que les solutions de lavage ont bien été éliminées.

16- Jeter le tube collecteur et Placer la colonne QIAamp dans un tube eppendorf stérile de 1,5 ml préalablement annoté

17- Ouvrir la colonne QIAamp pour y introduire 100µl d'eau RNase-DNase free (le tampon d'éluion fourni dans le kit peut aussi être utilisé).

18- Incuber à la température ambiante pendant 1 min et centrifuger à 8000 tours/min pendant 1 minute.

19- Eliminer la colonne et boucher les tubes Eppendorf qui contiennent l'éluat d'ADN.

**Ce dernier filtrat contient le matériel génétique (ADN) qui servira à lancer la PCR (Polymerase Chain Reaction).**

Conserver l'extrait d'ADN à la température de 2-8°C pour une utilisation immédiate ou à -20°C pour une conservation plus longue.



## Annexe 8: Comparaison charge virale m2000 vs SYBR Green

Identifiant	SYBR Green (log cp/ml)	m2000 (log cp/ml)	Différence (Sybr Green-m2000)
BIO-12	2,53	1,63	0,90
WS-6	2,81	2,38	0,43
WS-5	2,47	2,50	- 0,04
WS-15	2,39	2,56	- 0,17
WS-25	3,63	2,57	1,06
WS-60	2,38	2,61	- 0,24
WS-29	2,88	2,67	0,20
WS-9	2,79	2,68	0,11
BIO-21	2,61	2,79	- 0,19
BIO-20	2,35	2,83	- 0,48
WS-12	2,58	2,91	- 0,33
WS-11	3,02	2,97	0,05
BIO-16	2,21	3,02	- 0,81
WS-28	3,33	3,04	0,29
WS-49	2,82	3,11	- 0,29
WS-54	3,00	3,15	- 0,16
BIO-17	2,53	3,17	- 0,64
WS-13	2,74	3,18	- 0,44
PRO-14	2,95	3,19	- 0,24
WS-8	2,47	3,19	- 0,72
WS-19	2,70	3,23	- 0,53
WS-18	2,49	3,23	- 0,74
WS-41	3,55	3,24	0,30
WS-56	4,06	3,27	0,78
BIO-11	4,09	3,27	0,82
PRO-5	3,45	3,30	0,14
WS-52	3,18	3,34	- 0,16
WS-3	2,10	3,37	- 1,27
WS-26	4,90	3,40	1,50
WS-45	3,92	3,45	0,47
WS-42	3,98	3,52	0,46
WS-7	2,82	3,52	- 0,70
WS-48	4,15	3,55	0,60
PRO-4	3,02	3,59	- 0,57
WS-51	4,13	3,60	0,53
WS-32	3,97	3,62	0,34
WS-1	3,60	3,64	- 0,04

WS-23	4,35	3,67		0,68
BIO-10	2,97	3,67	-	0,71
WS-22	4,49	3,67		0,82
BIO- 5	2,79	3,83	-	1,04
WS-17	3,42	3,85	-	0,43
WS-24	4,21	3,87		0,34
PRO- 6	3,75	3,91	-	0,16
WS-59	4,26	3,95		0,31
WS-37	3,85	4,06	-	0,21
WS-44	3,71	4,18	-	0,48
WS-16	3,49	4,19	-	0,70
WS-39	3,82	4,33	-	0,51
WS-21	4,22	4,37	-	0,16
WS-50	4,34	4,42	-	0,09
WS-38	4,79	4,56		0,23
WS-53	4,07	4,59	-	0,52
WS-14	4,16	4,62	-	0,46
PRO-7	4,37	4,94	-	0,57
WS-55	4,26	4,98	-	0,72
PRO-15	4,09	5,09	-	1,01
PRO-9	4,40	5,19	-	0,79
WS-4	4,53	5,51	-	0,98
WS-58	4,36	5,55	-	1,19
PRO-12	4,81	5,61	-	0,80
BIO-6	4,97	6,13	-	1,16
WS-10	5,19	6,15	-	0,96
WS-2	5,56	7,09	-	1,54
WS-47	6,61	7,30	-	0,69
PRO-11	6,02	7,43	-	1,41
PRO-1	6,98	7,83	-	0,85
WS-46	6,90	8,35	-	1,45
PRO-2	8,22	9,28	-	1,06

# SERMENT DE GALIEN

---

*Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes Condisciples.*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*

*D'exercer, dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

## PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le président du jury

Vu :

Le Doyen.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le recteur, le Président de l'assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et par  
délégation

Le Doyen

# RESUME

L'infection par le Virus de l'Hépatite B (VHB) est un problème majeur de santé publique avec environ 2 milliards d'individus infectés dans le monde. Parmi eux, 370 millions sont atteints d'une infection chronique. Le Sénégal constitue une région de haute endémicité pour l'hépatite B, avec 11% de porteurs chroniques dans la population.

La gravité de l'infection réside dans le risque d'évolution vers une cirrhose, puis vers un hépatocarcinome, en l'absence de traitement. Les niveaux élevés d'ADN viral sont de bons prédicteurs de ces complications ; de plus, la mesure de la charge virale VHB présente un intérêt primordial dans la prise de décision pour la mise en place d'un traitement ainsi que dans le suivi des patients traités pour déceler un éventuel échec thérapeutique.

Au Sénégal, les plateformes techniques pour la mesure de la charge virale VHB ne sont pas toujours disponibles et leur coût élevé limite leur accès à une bonne partie de la population malade. Dans la présente étude, nous avons mis en place une technique maison de PCR en temps réel pour la mesure de la charge virale VHB, basée sur l'utilisation d'un agent intercalent, le SYBR Green I.

Dans un objectif de validation de la technique maison, certains critères de performance ont été évalués. Les résultats ont montré une bonne répétabilité avec des coefficients de variation de 2,74% et 1,28%, une bonne reproductibilité (2,44 % et 1,37%), ainsi qu'une faible incertitude ( $\pm 0,25$  log copies/ml) et l'absence de phénomènes de contaminations inter-échantillons. La comparaison de la technique maison avec la technique commerciale m2000 a montré un coefficient de corrélation ( $r=0.904$ ) et un biais (-0,26) satisfaisants. De plus, 84% des échantillons testés étaient concordants entre les 2 techniques. Et, plus de la moitié des échantillons discordants avaient une charge virale très élevée ( $> 5,53$  log copies/ml).

D'autre part, la technique maison du SYBR Green s'est avérée être moins coûteuse que les techniques commerciales Taqman et m2000 avec une durée d'analyse comparable à celle du m2000 et plus courte que celle de Taqman.

D'autres tests analytiques sont cependant nécessaires pour la validation de la technique maison selon les normes du COFRAC.

**Mots clés : Virus de l'Hépatite B, PCR en temps réel, charge virale, performances analytiques**