

**UNIVERSITE MOHAMMED V – AGDAL
FACULTE DES SCIENCES
Rabat**



THESE DE DOCTORAT

N° d'ordre : 2607

Présentée par

M^{me} Amina SBAI

Discipline : Biologie

Spécialité : Virologie

EPIDEMIOLOGIE, GENOTYPE ET FACTEURS DE RISQUE DE L'HEPATITE VIRALE B AU MAROC

Soutenue le 24 Novembre 2012 devant le jury :

Président :

M^r Saaïd Amzazi, Professeur à la faculté des Sciences de Rabat

Examineurs :

M^r Youssef Bakri, Professeur à la faculté des Sciences de Rabat

M^{me} Malika Essakalli, Professeur à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat

M^r Mohamed Benajiba, Directeur du Centre National de Transfusion Sanguine

Mr Abdelaziz Benjouad, Professeur à la faculté des Sciences de Rabat

M^r Abdelouaheb Bennani, Responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire à l'Institut pasteur du Maroc

A mes très chers parents

A mon mari et à mes enfants Yahya et Iliass

A mes frères et sœurs

A toute la famille

Et à tous mes amis

Avant-propos

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans le cadre de l'UFR de Biochimie Immunologie au département de Biologie de la faculté des Sciences de Rabat en collaboration avec le laboratoire de Biologie moléculaire à l'institut pasteur de Casablanca.

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Monsieur **Abdelaziz Benjouad** Professeur de l'enseignement supérieur et Directeur du Centre National de Recherche Scientifique et Technique (CNRST), et par le Docteur **Abdelouaheb Benani**, Responsable du laboratoire de Biologie moléculaire à l'institut pasteur de Casablanca.*

*Je remercie infiniment mon Directeur de thèse, le Professeur **Abdelaziz Benjouad**, d'avoir accepté d'encadrer ce travail et pour l'intérêt qu'il a accordé pour cette thèse. Qui a suivi mes travaux avec intérêt constant et une confiance imperturbable en leur réussite. Son encadrement et ses précieux conseils m'ont guidée tout au long de l'élaboration de ce travail. Son savoir et ses talents multiples m'ont profondément inspiré. Ses remarques pertinentes et d'une rare qualité scientifique resteront à jamais gravées dans ma mémoire. Qu'il trouve ici l'expression de mon respect, de ma profonde gratitude et de mon infinie reconnaissance.*

*Le travail présenté dans cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour sans la volonté, le soutien et l'aide du Docteur **Abdelouaheb Benani**, responsable du laboratoire de biologie moléculaire à l'institut pasteur de Casablanca. Je le remercie énormément d'avoir dirigé ce travail et de m'avoir fait confiance pour la réalisation de cette étude au sein de son laboratoire, tout en m'orientant de ses précieuses connaissances. Je lui serai éternellement reconnaissante pour la confiance qu'il m'a accordée en me faisant partager son enthousiasme pour la*

recherche et en me fournissant le cadre nécessaire à la réalisation de ce travail. Son rôle était déterminant dans l'aboutissement de cette étude. Qu'il trouve ici l'expression de tout mon respect, le témoignage de ma sincère gratitude et l'expression de ma très grande considération.

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Saaïd Amzazi**, Professeur de l'enseignement supérieur et Doyen de la faculté des Sciences de Rabat, d'avoir aimablement accepté de présider le jury de cette thèse. En témoignage de ma profonde estime et de ma respectueuse considération.*

*Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Youssef Bakri**, Professeur de l'enseignement supérieur à la faculté des Sciences de Rabat, d'avoir accepté de juger ce travail. Je le remercie infiniment pour son accueil et pour son intérêt pour ce travail. En témoignage de mon profond respect.*

*Je remercie Madame le Professeur **Malika Essakalli**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat et Chef de Service de Transfusion Sanguine et d'Hémovigilance au CHU de Rabat, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma très grande considération.*

*Je tiens à remercier vivement Monsieur **Mohamed Benajiba**, Docteur en Médecine, Spécialiste en Hématologie Clinique et Directeur du Centre National de Transfusion Sanguine, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. En témoignage de ma profonde estime et de ma haute considération.*

*Je pense également à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, en particulier **Mme Habiba Othmani** et **Dr Mohamed Khalil Chemaou Elfehri**.*

PUBLICATIONS

A. Sbai, A. Bennani, A. Benjouad, M. Hassar.

HBV genotypes in Morocco.

Journal of Clinical Virology 2007; 38:184–185.

A. Sbai, W. Baha, H. Ougabrai, T. Allalia, N. Dersi, F. Lazaar, M.M. Ennaji, A. Benjouad, A. El Malki, M. Hassar , A. Benani.

Prévalence de l'infection par le virus de l'hépatite B et l'évaluation des facteurs de risque au Maroc.

Pathologie Biologie 2012 ; 60 : 65-69.

RESUME

L'épidémiologie du virus de l'hépatite B (VHB) n'est pas connue avec précision au Maroc. L'objectif de cette étude est l'évaluation de la prévalence de l'infection par le VHB chez une population active marocaine, l'identification des génotypes du VHB en circulation au Maroc et la détermination des facteurs de risque chez les personnes positives pour l'AgHBs.

Un effectif de 16 634 volontaires, dont 10 003 sont de sexe masculin et 6631 de sexe féminin, a été dépisté pour l'AgHBs. Le dépistage du VHB a été réalisé par le test immunoenzymatique de type Elisa de troisième génération. Après le prélèvement sanguin, toutes les personnes de l'étude ont rempli un questionnaire structuré afin d'évaluer les facteurs de risque et les modes possibles de transmission de l'hépatite B au Maroc.

Un total de 276 personnes s'est révélé positif au test de dépistage, avec un taux de prévalence du portage de l'AgHBs estimé à 1,66% (2,16% chez les hommes contre 0,90% chez les femmes). Ces résultats montrent que le Maroc est un pays à faible endémicité.

Le génotypage a été réalisé sur un échantillon de 120 sérums de personnes infectées par le virus de l'hépatite B. La technique utilisée est basée sur le principe de l'hybridation inverse à l'aide de sondes spécifiques sur bandelettes de nitrocellulose «LINE Probe Assay: LIPA». Le résultat a montré l'existence de deux génotypes: le génotype D (96.6%) et le génotype A (3,4%), ce qui signifie que le génotype D prédomine dans les échantillons analysés dans cette étude.

L'utilisation du questionnaire structuré indique que les comportements sexuels à risque (43,84 % des 276 cas) sont parmi les principaux facteurs de risque de transmission du VHB.

Ces résultats démontrent la situation épidémiologique actuelle de l'infection par le VHB au Maroc, ainsi que le génotype et les facteurs de risque prédominants. Ces données sont d'un intérêt pour le diagnostic et le pronostic, ainsi que pour la décision thérapeutique, et peuvent constituer la base pour l'élaboration d'une stratégie nationale pour la prévention de la transmission du VHB.

Mots clés : Hépatite virale B, épidémiologie, prévalence, facteurs de risque, génotypes, Prévention

Abstract

Hepatitis B (HBV) epidemiology is not known with precision in Morocco. The objective of this study was the evaluation of the HBV infection prevalence in a Moroccan workers population. In addition we genotyped HBV positive patients and we identified the risk factors for HBsAg infection

A total of 16 634 individuals chosen randomly (10 003 male and 6631 female) were screened for HBsAg. Detection of HBV was performed using a immunosorbent third generation. After blood sampling, all in the study completed a structured questionnaire to assess risk factors and possible modes of transmission of hepatitis.

A total of 276 people were found positive for HBsAg, with a prevalence rate of HBsAg estimated at 1.66% (2.16% for men and 0.90% for women). These results showed that the Morocco is a country with low prevalence.

Genotyping HBV was performed for 120 individuals found infected with the hepatitis B virus. The technique used is based on the principle of reverse hybridization with specific probes on nitrocellulose strips "LINE Probe Assay: LIPA". The result revealed the existence of two genotypes: genotype D (96.6%) and genotype was (3.4%).

The use of the structured questionnaire indicated that sexual behaviors were among the main factors of risk of transmission of HBV (43.84%).

These results demonstrated the current epidemiological situation of HBV infection in Morocco. These data are of interest for the diagnosis and prognosis, and therapeutic decision, and can be for the development of an eventual national strategy for the prevention of the transmission of HBV.

Key words: Hepatitis B virus, Epidemiology, prevalence, risk factors, genotypes, prevention

SOMMAIRE

Avant-propos	2
PUBLICATIONS	4
RESUME	5
Abstract.....	6
Abréviations	11
Liste des figures	12
Liste des tableaux.....	13
INTRODUCTION	14
CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. Les hépatites	18
II. Les virus des hépatites virales	18
A. Virus des hépatites à transmission entérique.....	19
1. Le virus de l'hépatite A (VHA).....	19
2. Le Virus de l'hépatite E (VHE)	20
B. Virus des hépatites à transmission sanguine	21
1. Le virus de l'hépatite B (VHB).....	21
2. Le virus de l'hépatite C (VHC)	22
2. Le virus de l'hépatite delta (VHD).....	23
III- Comparaison des principales caractéristiques des virus des hépatites :	25
IV. L'Hépatite virale B	26
A. Historique.....	26
B. Biologie du virus de l'hépatite B	26
1. Taxonomie	26
2-Structure du VHB.....	28
a. Particules subviraux.....	29
b. particules virales complètes	29
c. Génome du VHB :.....	30
c.1. L'Ag HBs et les Protéines PrS1, PrS2	32
c.2. L'antigène HBc et l'antigène HBe.....	33
c.2.1. L'antigène HBc.....	33
c.2.2. L'antigène HBe.....	34
c.3. L'ADN polymérase	34
c.4. La protéine X	35
3. Réplication du Virus de l'hépatite B	36
4. Variabilité du génome du VHB.....	38
a. Variants génotypique du VHB	39
b. Mutants du VHB	42
b.1. Mutations au niveau du gène S	42
b.2. Les mutants "précore" ou pré-C, au niveau du gène C	43
b.3. Mutations du gène de la polymérase virale	44
b.4. Mutation au niveau du gène X	46
C. Réponse immunitaire liée à l'infection par le VHB	46
D. Epidémiologie du VHB.....	48
1. Séro-épidémiologie	48

2. Epidémiologie moléculaire.....	49
E. Transmission et facteurs de risque du VHB	51
1. Transmission parentérale	52
2. Transmission de personne à personne	52
3. Transmission périnatale.....	53
F. Histoire naturelle de l'infection par le VHB et signes cliniques	54
1. Hépatite aiguë.....	54
2. Hépatite fulminante	55
3. Hépatite chronique.....	55
4. Le virus de l'hépatite B et cancer du foie.....	56
G. Diagnostic virologique de l'hépatite virale B.....	58
1. Marqueurs sériques utilisés en routine	58
a. tests de détection des antigènes du VHB et des anticorps anti-VHB	59
b. Recherche d'ADN viral	60
2. Les nouveaux marqueurs virologiques	61
a. Les méthodes de génotypage	61
a.1. Séquençage et analyse phylogénétique	61
a.2. Analyse par polymorphisme de restriction	62
a.3. Utilisation d'amorces spécifiques de type	63
a.4. Hybridation sur support solide	63
a.5. Tests sérologiques	63
b. Profil des substitutions amino-acidiques associées à la résistance au traitement de l'hépatite B	65
c. Quantification de l'ADNccc intra-hépatique et de l'Ag HBS sérique	65
H. Traitement de l'hépatite virale B	66
I. Vaccination contre l'hépatite virale B	69
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODE.....	71
A. Etude épidémiologique.....	72
1. Population étudiée	72
2. Prélèvements	72
3. Dépistage du VHB.....	73
3.1. Principe de la méthode	73
3.2. Procédure du dosage	74
3.3. Résultats et interprétation.....	76
4. Test de confirmation.....	76
4.1. Principe de la méthode :	77
4.2. Procédure du test :	77
4.4. Lecture des résultats :	79
4.5. Interprétation des résultats	79
5. Recherche de l' ADN viral	80
5.1. Extraction automatisée par le COBAS AmpliPrep :.....	80
5.2. Amplification et détection de l'ADN viral par PCR en temps réel.....	81
5.2.1. Principe de la méthode :	81
5.2.2. Sélection de la cible :	81
5.2.3. Amplification de la cible :	82
5.2.4. Amplification sélective :	82
5.2.5. Détection des produits PCR dans un test COBAS TaqMan 48 :	83
B. Génotypage VHB	84
1. Extraction de l'ADN :	84
1.1. Principe de la méthode :	85
1.2. Procédure du test :	85

2. Amplification de l'ADN.....	87
2.1. Choix des amorces :	87
2.2. Principe de la méthode :	87
2.3. Révélation des produits de PCR :	88
2.3.1 Préparation d'un gel d'agarose à 2 % :	88
2.3.2 Préparation de la cuve à électrophorèse :	89
2.3.3. Lecture des résultats	90
3. Test INNO LIPA genotyping.....	90
3.1 Principe du test INNO LIPA genotyping	90
3.2. Procédure du test :	91
3.2.1. Dénaturation des échantillons	92
3.2.2. Hybridation des échantillons	92
3.2.3 Le lavage des bandelettes	93
3.2.4 Révélation:.....	93
3.3. Interprétation des résultats :	95
C. facteurs de risque de l'infection par le VHB	96
D. Analyse statistique	98
CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION	99
A- Prévalence de l'AgHBs	100
1. Traitement et analyse de données :	100
2. Dépistage de l'Ag HBs :	101
3. Test de confirmation	101
4. Prévalence de l'AgHBs en fonction de la tranche d'âge	103
5. Prévalence de l'AgHBs en fonction du sexe.....	105
6. Recherche de l' ADN viral.....	108
B. Génotypage VHB	110
C. Facteurs de risque de l'infection par le VHB	114
CHAPITRE 4: DISCUSSION GENERALE	126
CONCLUSION GENERALE	140
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNccc	Covalently closed circular DNA
Ag HBc	Antigène de capside de l'hépatite B
Ag HBe	Antigène e de l'hépatite B
Ag HBs	Antigène de surface de l'hépatite B
ALAT	Alanine Amino Transférase
AN	Acides nucléiques
CHC	Carcinome hépatocellulaire
dNTP	désoxyribonucléotides triphosphate
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
MHL	Major hydrophilic loop (la boucle antigénique majeur)
OMS	Organisation mondiale de la santé
pb	Paire de Base
PCR	polymerase chain reaction
RT	Rétrotranscriptase
SQ	Standard de quantification
VHA	Virus de l'hépatite A
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHD	Virus de l'hépatite D
VHE	Virus de l'hépatite E
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des figures

Figure 1: structure de la particule virale du VHA.....	20
Figure 2: structure de la particule virale du VHE.....	21
Figure 3: Structure de la particule virale du virus de l'hépatite B	22
Figure 4: Structure de la particule virale du virus de l'hépatite C	23
Figure 5: Structure de la particule virale du virus de l'hépatite D	24
Figure 6: Arbre phylogénétique des orthohepadnavirus.	27
Figure 7: Représentation schématique de la structure des particules du VHB	28
Figure 8: Schémas du virion du VHB	30
Figure 9: Organisation du génome du VHB et phase de lecture.....	31
Figure 10: Représentation schématique de la structure de l'ADN polymérase du VHB	35
Figure 11: Schémas illustrant la multiplication du VHB dans l'hépatocyte	38
Figure 12: Mutants pré-core du virus de l'hépatite B.....	44
Figure 13: Les principales mutations du gène de la polymérase virale responsable de résistance aux antiviraux	46
Figure 14: Distribution géographique de l'HBV dans le monde.....	49
Figure 15 : Répartition géographique des géotypes du virus de l'hépatite B dans le monde	50
Figure 16 : Histoire naturelle de l'infection virale B	58
Figure 17: Principe du test Elisa	74
Figure 18: Configuration du test de confirmation pour la détection des AgHBs	78
Figure 19: Principe du test INNO LIPA genotyping	91
Figure 20: Représentation graphique de la bande du Test INNO-Lipa HBV Genotyping	95
Figure 21 : prévalence de l'Ag HBs selon les tranches d'âge	104
Figure 22: Répartition de la prévalence de l'Ag HBs selon le sexe.....	106
Figure 23: Prévalence de l'Ag HBs selon l'âge et le sexe.....	108

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales caractéristiques des virus des hépatites virales.....	25
Tableau 2: Résidus impliqués dans les déterminants "d/y" et "r/w" de l'AgHBs.....	40
Tableau 3: Les génotypes du VHB	41
Tableau 4: Mutants de l'AgHBs échappant à la vaccination	42
Tableau 5 : Principaux profils observés dans différentes situations cliniques au cours de l'infection par le VHB	56
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes de génotypage du VHB et de leurs avantages et inconvénients	64
Tableau 7 : Premiers résultats obtenus après exploitation des données	100
Tableau 8 : Exemple de résultat de dépistage de l'AgHBs et du test de confirmation	102
Tableau 9: Prévalence générale de l'AgHBs chez les sujets dépistés.....	103
Tableau 10 : Exemple de résultat de la recherche de l'ADN viral (PCR qualitative) et sa quantification par PCR en temps réel	109
Tableau 11 : Comparaison des résultats de génotypage rapportés par différentes études.....	113
Tableau 12: Facteurs de risque de l'infection par le VHB chez le groupe G1 (patients positifs pour AgHBs) et chez le groupe témoin G2.....	115
Tableau 13 : Concomitance des risques d'infection par le VHB chez la population étudiée.....	117

INTRODUCTION

L'hépatite B représente la principale cause de pathologie hépatique aigue ou chronique dans le monde, comme par exemple les cirrhoses ou le carcinome hépatocellulaire. L'OMS estime à deux milliards le nombre de personnes ayant été exposées à ce virus, soit une personne sur trois, et près de 10 à 30 millions de nouvelles contaminations par an. Le nombre de porteurs chronique est estimé à plus de 350 millions, avec près de 1 million de décès chaque année.

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

Le virus de l'hépatite B est un virus extrêmement contagieux, il est cent fois plus contagieux que le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine), et peut rester stable à 25°C pendant sept jours dans du sang séché.

Le VHB se transmet par effraction cutanée ou par contact des muqueuses avec du sang ou d'autres liquides organiques contaminés. Les concentrations les plus élevées du virus se retrouvent dans le sang et les lésions suintantes, alors qu'on relève des concentrations modérées dans le sperme et les sécrétions vaginales, et des concentrations plus faibles dans la salive.

Les principales voies de transmission sont :

- Transmission par voie parentérale.
- Transmission de personne à personne.
- Transmission de la mère à l'enfant au cours de la période périnatale.

L'infection par le VHB est mondialement répandue mais répartie de façon irrégulière, délimitant trois catégories de zones géographiques: les zones de forte endémicité (>8 % de la population générale est infectée de manière chronique), les zones d'endémicité intermédiaire (2 à 7 % de la population est infectée de manière

chronique) et les zones de faible endémicité (< 2 % de la population est atteinte d'infection chronique).

La variabilité du génome du VHB a permis de classer la population du VHB humaine en géotypes dont la répartition à travers le monde est ubiquitaire. Ils ont été déterminés, dans la plupart des cas, à partir de la région préS2. Actuellement huit géotypes sont identifiés, représentés de A à H. Ces différents géotypes présentent une distribution géographique distincte.

Avant l'introduction du vaccin contre l'hépatite B dans le programme élargi de vaccination (PEV), le Maroc était un pays considéré, Selon les données de l'OMS, comme ayant une prévalence intermédiaire de l'hépatite B.

Actuellement, l'épidémiologie du virus de l'hépatite B (VHB) n'est pas connue avec précision au Maroc. Ainsi, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer la prévalence de l'infection par le VHB chez une population active marocaine.

La présente étude a visé également l'identification des géotypes du VHB en circulation au Maroc, ainsi que l'évaluation des facteurs de risque chez les personnes positives pour l'AgHBs.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les hépatites

Les hépatites sont des atteintes inflammatoires du foie d'étiologies diverses: infectieuses, médicamenteuses, toxiques ou auto-immunes. Quelle que soit l'origine de la pathologie, des signes cliniques communs peuvent être observés : ictère fébrile, prurigineux, décoloration des selles, brunissement des urines et augmentation de la concentration en transaminases dans le plasma, signes d'une cytolyse et d'un dysfonctionnement hépatique. Parmi les hépatites infectieuses; celles virales tiennent une place très importante.

Le terme "hépatite virale" est utilisé pour décrire l'atteinte hépatique causée par les virus dont l'hépatotropisme est dominant et exclut ceux qui n'atteignent que secondairement ou occasionnellement le foie tels que les Herpesviridae (Cytomégalo virus, virus d'Epstein-Barr, virus Herpes simplex), ou le virus de la fièvre jaune par exemple. Les virus ayant un tropisme hépatique quasi exclusif sont responsables de ce qui est communément appelé «hépatites virales», ils sont actuellement au nombre de cinq et désignés alphabétiquement de A à E (Khuroo 2003, zoulim 2006). Plus récemment, un virus dit de l'hépatite G a été caractérisé sans que son implication dans des pathologies hépatiques soit établie (Chams et al 2003, Ramezani et al 2008, Maaref et al 2009).

II. Les virus des hépatites virales

Les hépatites virales regroupent les infections provoquées par des virus se développant aux dépens du tissu hépatique. L'infection humaine par les virus des l'hépatites est associée à une première phase d'incubation durant laquelle le virus atteindra les hépatocytes, puis une phase de réplication et de production qui conduisent à la libération de particules virales dans la circulation sanguine.

Les hépatites virales sont essentiellement dues à cinq virus différents appartenant à des familles distinctes; ils sont classés schématiquement en deux groupes sur la base de leurs modes de transmission et de leur évolution clinique (Buisson et al 1994, Handra-Luca et al 2007):

- Le premier comprend les virus des hépatites A (VHA) et E (VHE) à transmission oro-fécale, évoluant par épidémies et caractérisés par l'absence d'infection chronique.
- Le second groupe inclut les virus des hépatites B (VHB), C (VHC), et D (VHD) à transmission parentérale. Ces virus sont caractérisés par le risque d'évolution vers la chronicité, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC).

A. Virus des hépatites à transmission entérique

1. Le virus de l'hépatite A (VHA)

Le virus de l'hépatite A a été identifié pour la première fois en 1973 par Feinstone et ses Collaborateurs par immuno-microscopie électronique dans les selles d'un sujet atteint d'hépatite dite "épidémique" (Cristina et al 2007). C'est un petit virus de 27 à 30 nm de diamètre, non enveloppé, appartenant à la famille des Picornaviridae, genre Hépatovirus. Son génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin, linéaire, de 7500 nucléotides et de polarité positive. Son organisation génomique est similaire à celle des autres picornavirus: un cadre unique de lecture ouvert codant une polyprotéine, encadré en 5'et en 3'de régions non codantes (NTR) (Cristina et al 2007, Desbois et al 2011). La région 5'NTR, très structurée, renferme le site interne d'entrée des ribosomes (IRES), essentiel à la traduction de la polyprotéine virale.

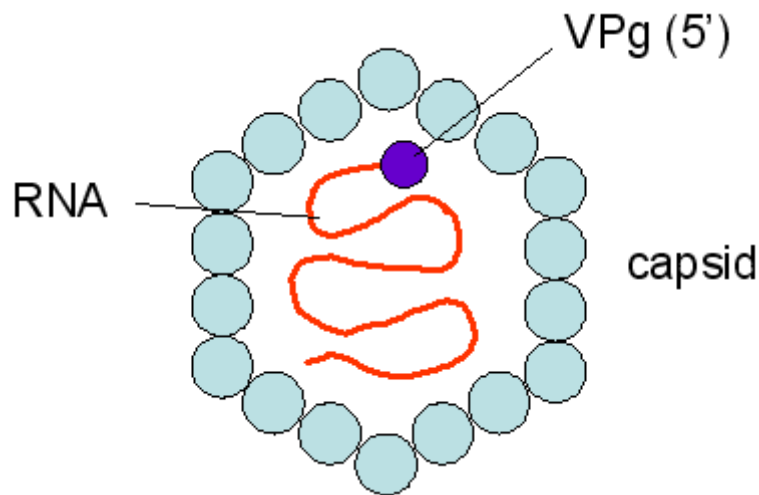


Figure 1: structure de la particule virale du VHA

L'hépatite A est la plus fréquente des hépatites infectieuses aiguës dans le monde. Sa distribution géographique, comme celle de l'ensemble des maladies du péril fécal, varie en fonction des conditions socioéconomiques et du niveau sanitaire du pays (Amri et al 2011).

Six génotypes sont actuellement décrits: les génotypes I à III subdivisés chacun en sous-types A et B infectent l'homme, tandis que les génotypes IV à VI sont d'origine simienne (Desbois et al 2011).

2. Le Virus de l'hépatite E (VHE)

La caractérisation du virus de l'hépatite E est liée à deux dates majeures: 1983, avec la mise en évidence par Balayan, du caractère filtrable et transmissible de l'agent infectieux responsable d'épidémies d'hépatites aiguës, et 1991 avec la caractérisation moléculaire de cet agent infectieux (Nicand et al 2009). Le VHE est un virus à ARN monocaténaire linéaire, de polarité positive d'environ 7,2 kilobases, il est classé actuellement dans la famille des Hepeviridae, et se présente, en microscopie électronique, sous la forme de particules sphériques, non enveloppées de 27 à 34 nm de diamètre avec quatre génotypes différents (I à IV). L'ARN est coiffé en 5' (7 méthyl guanine) et polyadénylé en 3'. Il comporte trois phases ouvertes de

lectures (ORF1, ORF2 et ORF3) flanquées de régions non codantes en 5' et 3' (Izopet 2010)

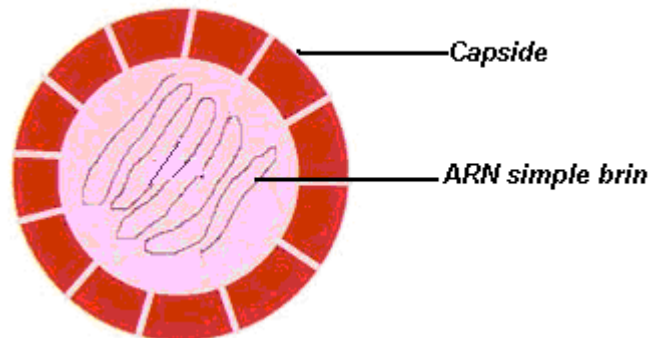


Figure 2: structure de la particule virale du VHE

La transmission du virus de l'hépatite E (VHE) se fait principalement par voie entérale, et les conditions précaires d'hygiène contribuent à la forte prévalence de l'infection dans les régions endémiques. Dans les pays développés et non endémiques, les cas sporadiques d'hépatite E sont liés à un séjour en zone endémique mais aussi à des cas autochtones. La présence d'un réservoir animal du virus peut également constituer une source de contamination (Hannachi et al 2009).

B. Virus des hépatites à transmission sanguine

1. Le virus de l'hépatite B (VHB)

Le virus de l'hépatite B (VHB) fait partie de la famille des Hepadnaviridae, c'est un petit virus composé d'une nucléocapside entourée d'une bicouche lipidique sur laquelle s'insèrent les protéines de surface (Wagner et al 2004). Le génome est un acide désoxyribonucléique (ADN), sphérique, partiellement double brin, non fermé de manière covalente. Il existe huit génotypes distincts d'HBV ainsi que de nombreux sérotypes.

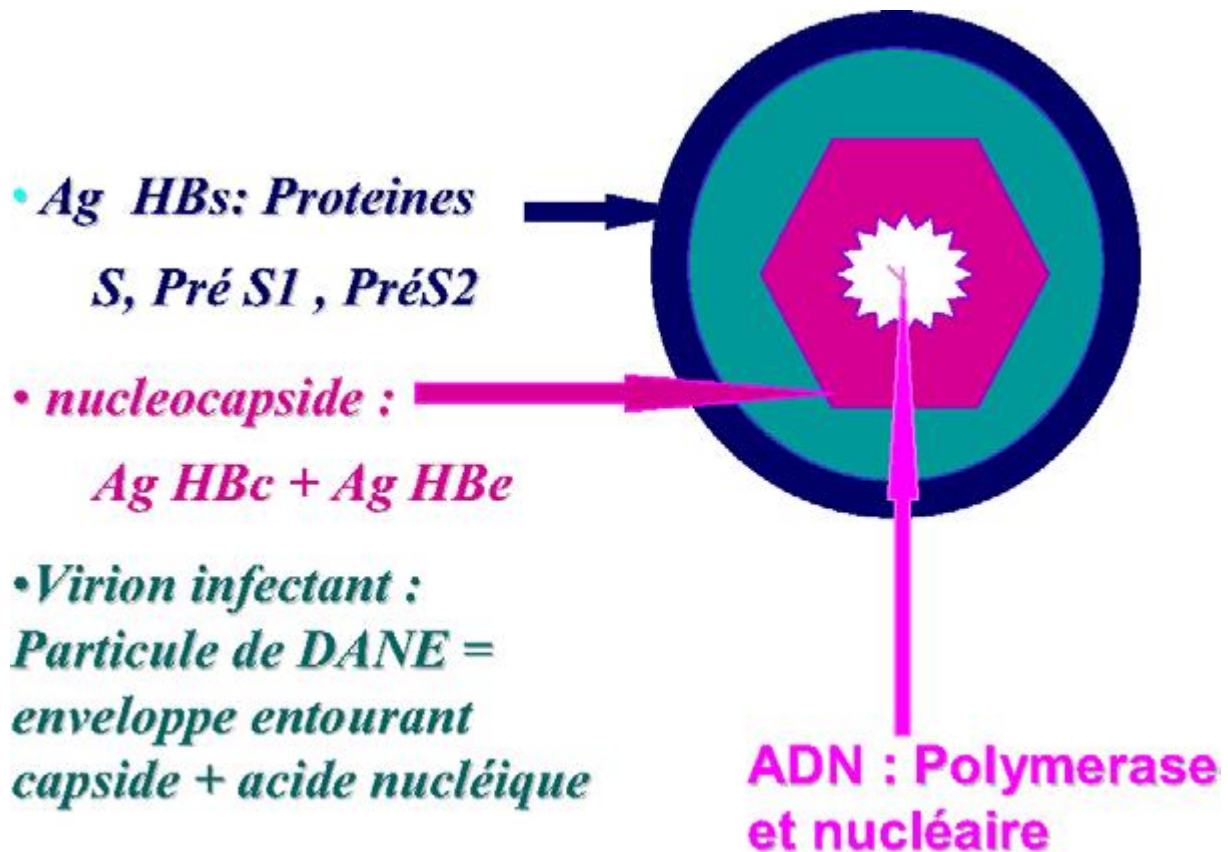


Figure 3: Structure de la particule virale du virus de l'hépatite B (Ajana 2006)

L'hépatite B peut aller de la forme asymptomatique à la forme fulminante. L'évolution vers une forme chronique est d'autant plus probable que la phase aigüe a été peu symptomatique exposant au risque de complications graves (cirrhose, hépatocarcinome, maladies auto-immunes) (Chemin et al 2009).

2. Le virus de l'hépatite C (VHC)

Le virus de l'hépatite C appartient à la famille des Flaviviridae, il a été identifié en 1989 par les équipes de Michael Houghton. C'est un virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre, son génome est un ARN monocaténaire linéaire, de polarité positive d'environ 10 000 nucléotides avec deux régions non codantes, situées aux extrémités 5' et 3' du génome et nommées respectivement 5'NC et 3'NC, elles encadrent la partie codante constituée d'un cadre unique de lecture (Thiers et al 2000, Bartenschlager et al 2007, Gaudy et al 2005). Ce virus très variable possède

six génotypes et de nombreux sous-types dont la distribution varie avec le mode de contamination et la zone géographique (Schramm et al 2008, Bennani 2002). Le VHC est responsable de la majorité des hépatites non A non B à transmission majoritairement parentérale.

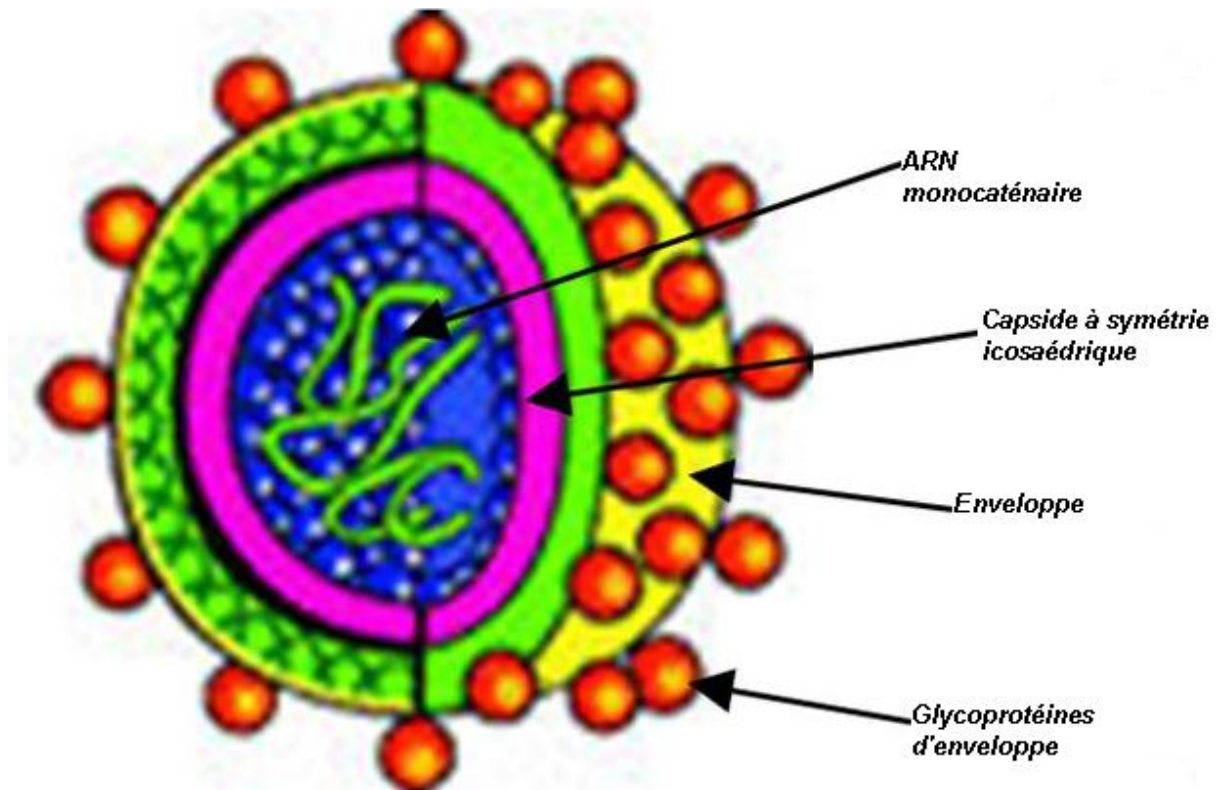


Figure 4: Structure de la particule virale du virus de l'hépatite C

2. Le virus de l'hépatite delta (VHD)

Le virus de l'hépatite D, habituellement appelé Delta, est le plus petit virus à ARN connu. Il a été découvert en 1977 par Rizzetto et ses collaborateurs (Dubois et al 1990). Le VHD est un virus défectif qui dépend étroitement du virus B pour sa réplication. Il possède un très petit génome qui est un acide ribonucléique (ARN) circulaire, simple brin d'environ 1680 nucléotides de polarité négative. Le VHD est un petit virus de 37 nm de diamètre. Son enveloppe est formée de membranes lipidiques où sont ancrées les glycoprotéines du VHB qui portent l'antigène HBs.

(AgHBs) (figure 5). A l'intérieur, se trouvent les constituants spécifiques du VHD. La fixation et la pénétration du VHD se fait grâce aux protéines d'enveloppe dérivées du VHB, alors que la réplication du génome du VHD s'effectue dans le noyau et elle est indépendante du VHB. Le virus de l'hépatite D constitue un modèle de réplication unique dans le monde des virus infectant l'homme (Deny et al 1996).

La surinfection par le VHD d'une infection chronique déjà établie par le VHB induit une hépatite aiguë plus sévère qu'en cas de coinfection concomitante par les deux virus (Dubois et al 1990).

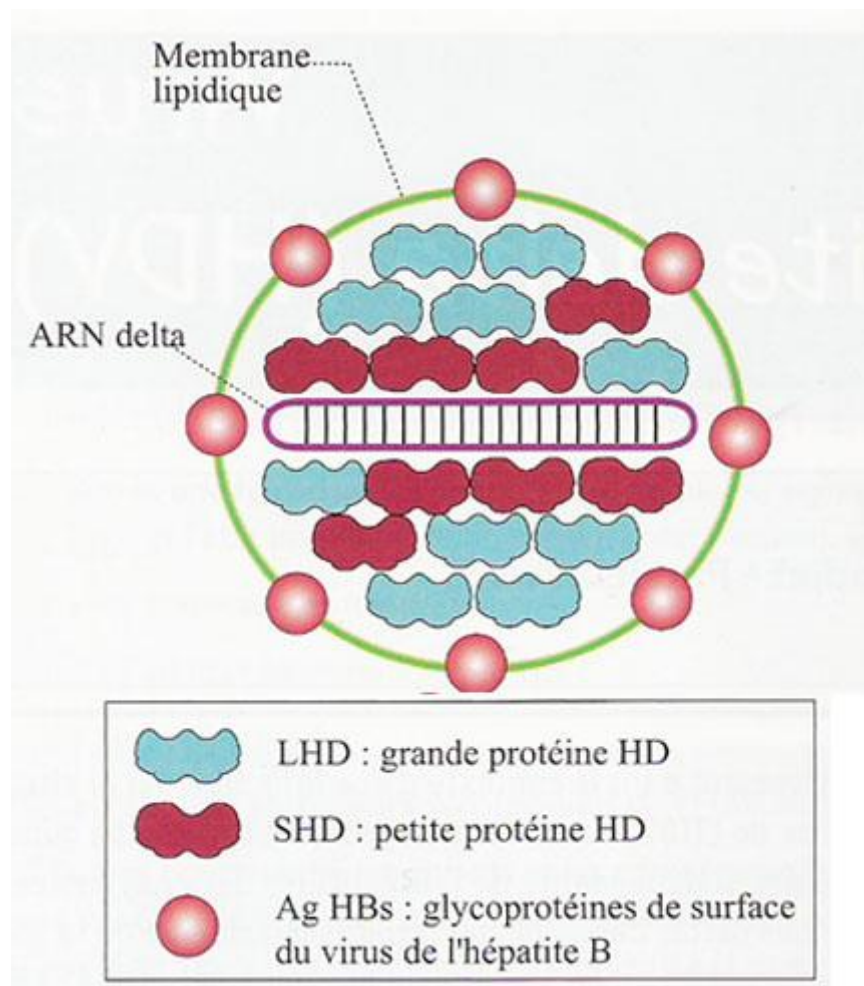


Figure 5: Structure de la particule virale du virus de l'hépatite D

III- Comparaison des principales caractéristiques des virus des hépatites :

Bien qu'ils présentent des pouvoirs pathogènes très proches, les virus des hépatites A, B, C, D et E appartiennent à des familles virales bien différentes et s'individualisent par leurs modes de transmission et leurs modalités évolutives.

Les Principales caractéristiques des virus de ces hépatites virales sont résumées dans le tableau 1.

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

Tableau 1: Principales caractéristiques des virus des hépatites virales

IV. L'Hépatite virale B

A. Historique

Le virus de l'hépatite B a été découvert en 1963, quand B.S. Blumberg a mis en évidence une réaction inhabituelle entre le sérum d'individus polytransfusés et celui d'un aborigène australien. Il a alors désigné l'antigène découvert sous le nom d'antigène « Australia » (Alter et al 1966). En 1967 le nom d'antigène HBs, c'est-à-dire antigène de surface de l'hépatite B, fut imposé pour désigner cet antigène (Blumberg et al 1967) dont la découverte a valu à B.S. Blumberg le prix Nobel en médecine en 1976.

En 1970, D.S. Dane identifiait en microscopie électronique, dans le sérum de malades porteurs de l'antigène Au, des particules "en cocarde" de 42 nm de diamètre (les particules de Dane), qui devaient ultérieurement être considérées comme les particules virales infectieuses du virus de l'hépatite B (Denis 1999).

B. Biologie du virus de l'hépatite B

1. Taxonomie

La famille des Hepadnaviridae constitue avec celle des Caulimoviridae le groupe des "para rétrovirus" dont le génome est constitué d'un ADN circulaire, partiellement double brin. Ils possèdent une polymérase qui est une ADN polymérase ARN dépendante et ADN dépendante (transcriptase inverse) associée à une ARNase H (Wagner et al 2004).

La famille des Hepadnaviridae regroupe deux genres: orthohepadnavirus et Avihepadnavirus (Schaefer 2007).

- Le genre orthohepadnavirus comprend le virus de l'hépatite B humain ainsi que le virus des rongeurs : Woodchuck Hepatitis virus (WHV) chez la marmotte, Ground Squirrel Hepatitis virus (GSHV) chez les tamarins, Arctic

Squirrel Hepatitis Virus (ASHV) chez l'Ecureuil terrestre arctique, et les virus des singes HBVcpz (chimpanzés, gorille), HBVoru (orang-outang), HBVgbn (gibbon), WMHBV (singe laineux).

- Le genre Avihepadnavirus regroupe les virus du canard de Pékin (Duck Hepatitis B virus : DHBV), du héron (Heron Hepatitis B virus HHBV) et de l'oie des neiges (Ross's Goose Hepatitis B virus : SGHBV). Ils diffèrent des mammifères par l'absence du gène X.



Figure 6: Arbre phylogénétique des orthohepadnavirus.

Les génomes complets des génotypes du VHB : A (X02763), B (D00330), C(M12906), D (V01460), E (X75657), F (X69798), G (AF160501), H (AY090454), VHBcpz (D00220), VHBoru (NC002168) et VHBgbn (U46935), ont été alignés aux génomes du WMHBV (AF046996), du WHV (J02442), du GSHV (K02715) et du ASHV (nc_001719) en utilisant : "clustal w" (Schaefer et al 2007).

2-Structure du VHB

Le virus de l'hépatite B, possède une structure très complexe dont la connaissance est nécessaire, car le diagnostic virologique indirect repose sur l'identification des Ag et des Ac correspondant aux différentes parties de sa structure (Zoulim 2000, Ayari et al 2006).

L'examen du sang infecté par le VHB à l'aide du microscope électronique montre l'existence des trois formes suivantes (Patient et al 2008): (figure 7)

- Des particules dites subviraux qui sont de formes sphérique ou filamenteuse.
- Des particules virales complètes ou particules de DANE qui représentent le virion complet.

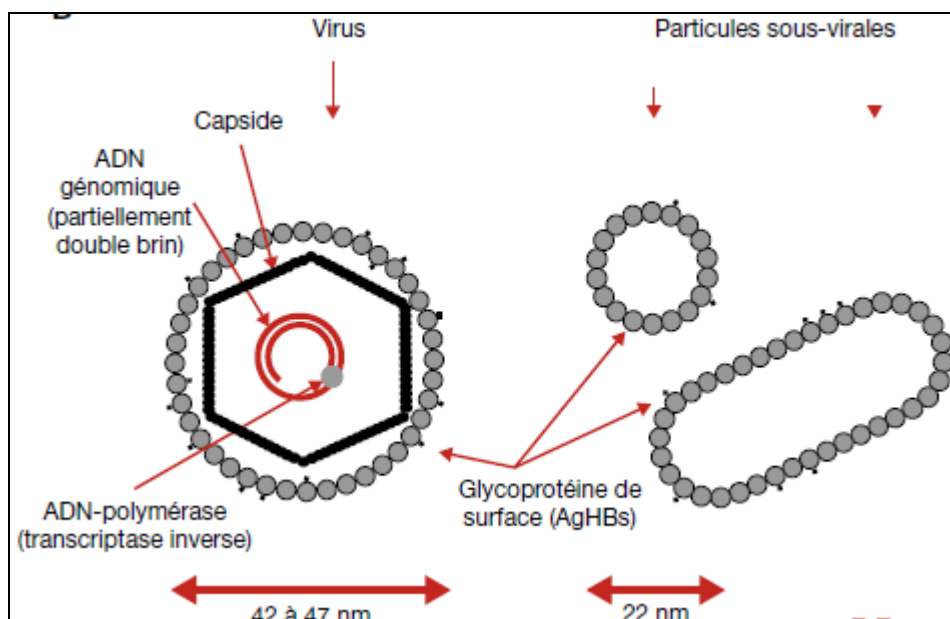


Figure 7: Représentation schématique de la structure des particules du VHB (Patient et al 2008).

a. Particules subviraales

Les particules subviraales sont des enveloppes lipoprotéiques vides constituées de lipides d'origine cellulaire et d'antigènes viraux de surface (AgHBs)(Gerlich et al 1993), elles peuvent être de formes sphériques ou filamenteuses :

- Les particules sphériques de 22 nm de diamètre constituant l'AgHBs synthétisés en excès.
- Les particules filamenteuses résultants des particules sphériques mises bout à bout, elles sont de 40 à 400 nm de diamètre, composé d'une nucléocapside entourée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérés des protéines de surface.

Le titre des particules subviraales dans le sérum des patients peut atteindre un niveau 10000 fois supérieur à celui des virus complets (Bruss 2007).

b. particules virales complètes

Le virion complet ou particule de DANE est une particule sphérique de 42 à 47 nm de diamètre (Seitz et al 2007, Patient et al 2008), il est constitué : (figure 8)

- D'une enveloppe formée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire, à la surface de laquelle sont ancrées trois protéines virales de taille croissantes ; S (protéine majeure), M (protéine moyenne) et une grande protéine dite "L".
- D'une nucléocapside centrale de 27 nm de diamètre, que l'on peut extraire par des détergents (Tween 80), elle est formée de protéines antigéniques portant L'Ag de capsid, AgHBc et l'AgHBe et à l'intérieur on trouve le génome du VHB.
- D'une polymérase virale du VHB qui possède une activité de transcription inverse et une activité d'ADN-polymérase. L'activité de l'enzyme ne s'exprime dans la cellule infectée, qu'à l'intérieur de nouvelles capsides virales

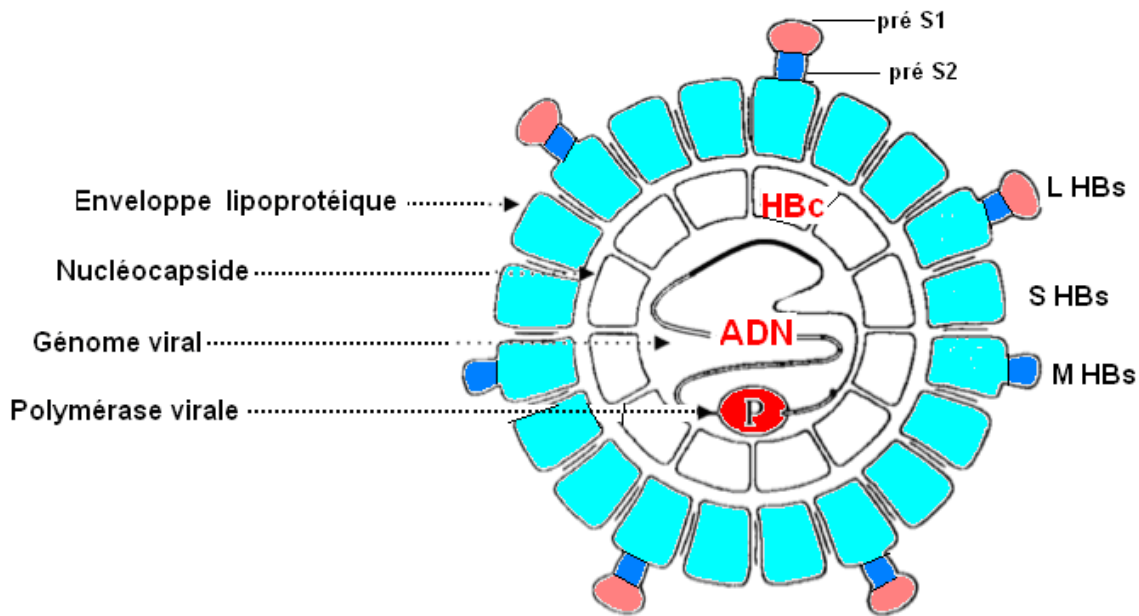


Figure 8: Schémas du virion du VHB (Gerlich et al 1993)

c. Génome du VHB :

Le VHB est un virus enveloppé qui possède le plus petit génome de tous les virus animaux connus. Ce génome est un acide désoxyribonucléique (ADN), de 3200 paires de bases (pb), circulaire, partiellement double brin et non fermé de manière covalente. Cette configuration circulaire est maintenue par un appariement des extrémités 5' des deux brins, de longueur différente: un brin long et complet (brin moins) qui contient la totalité du patrimoine génétique du virus et un brin incomplet (brin plus) non codant et de taille variable, allant de 50 à 80 % de la longueur du brin long. Cette structure particulière est liée au mécanisme de réplication spécifique de ce virus. Son organisation génétique est très compacte avec quatre cadres de lecture ouverts: S, C, P, et X (figure 9) (Hilmer et al 2008, Raimondo et al 2007).

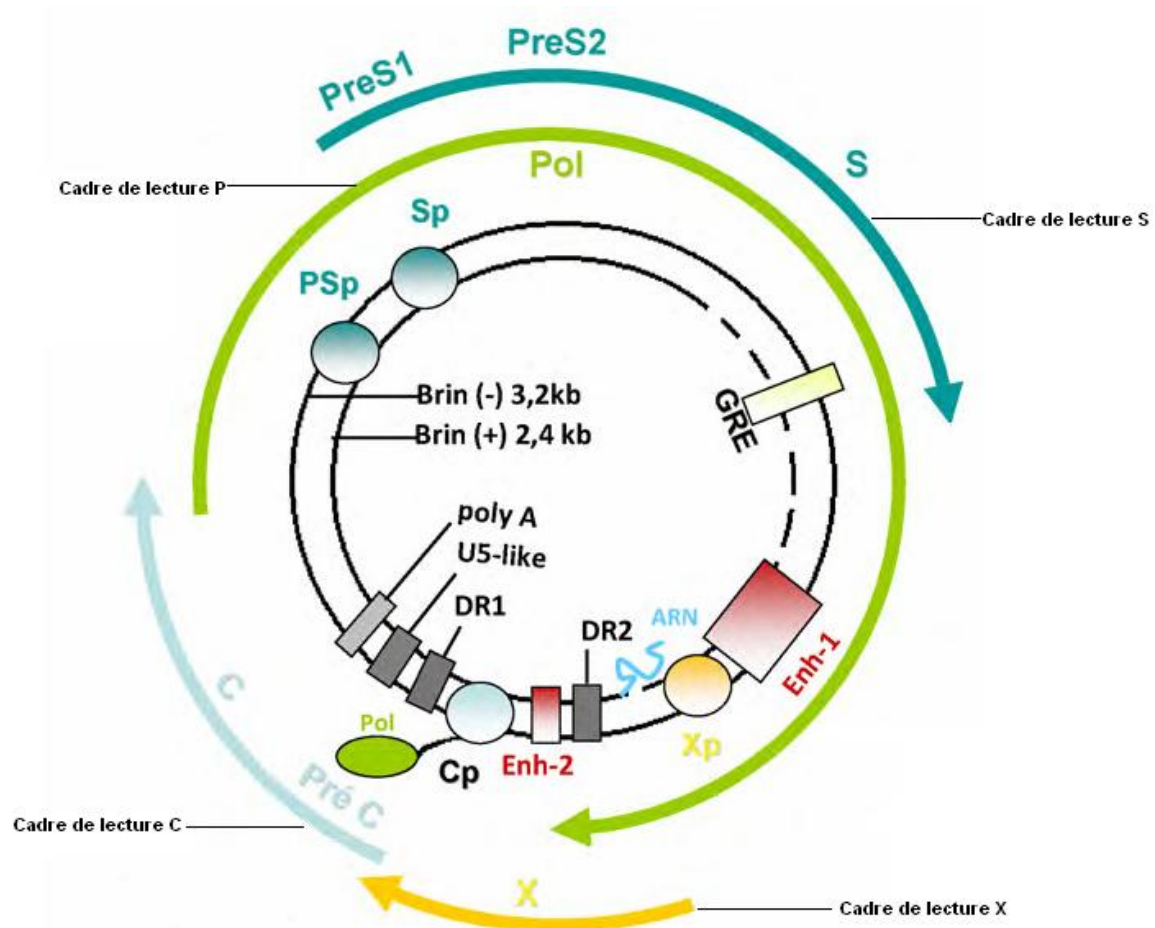


Figure 9: Organisation du génome du VHB et phase de lecture (Dény et al 2010).

Le chevauchement des gènes et l'utilisation de codon d'initiation de transcription alternatifs permettent la synthèse de 7 protéines virales distinctes et expliquent la petite taille du génome du virus.

- Le cadre S code pour les protéines d'enveloppe: il est composé du gène S, de la région pré S1 et de la région pré S2. le gène S code pour l'Ag de surface HBs, et les régions préS1 et S2 codent pour les antigènes de surface préS1 et préS2. Ces protéines d'enveloppe se présentent sous trois formes: petite, moyenne et grande, de 24, 33 et 39 kDa, selon qu'elles viennent de l'expression du gène S, de pré-S2 + S, ou pré-S1+ pré-S2 + S (figure 8). Les protéines de surface sont synthétisées largement en excès par les

hépatocytes infectés, seule une faible proportion participe à la formation des nouvelles particules virales infectieuses (Ben Slama et al 2010), la majorité d'entre elles formant des particules vides (Fig. 7)

- Le cadre C code deux protéines: les protéines "précore" (Ag HBe) et "core" (protéine de capsid ou AgHBc de 21 kDa).
- Le cadre P code la polymérase et plus précisément l'ADN polymérase, de 90 kDa qui possède un domaine transcriptase inverse et un domaine RNase H.
- Le gène X code pour la protéine X impliquée dans l'initiation et le maintien de la réplication du VHB après l'infection d'hépatocytes (Zoulim et al 2010).

c.1. L'Ag HBs et les Protéines PréS1, PréS2

L'antigène HBs (AgHBs), longtemps appelé Antigène Australia, est la protéine majeure de l'enveloppe du virus de l'hépatite B (fig 8) commune aux 3 protéines de surface assurant leur ancrage dans la bicouche lipidique de l'enveloppe virale ou dans la membrane du RE, là où elles sont synthétisées (Bruss et al 1991)

L'Ag HBs est présent dans le sang et dans les hépatocytes, et il est le marqueur sérologique le plus couramment utilisé pour le diagnostic des infections aiguës et chroniques dues au VHB, et pour le dépistage des donneurs de sang et d'organes (Roque-Afonso et al 2005).

En ce qui concerne sa structure antigénique, l'antigène HBs est une protéine de 226 acides aminés qui se subdivise en sous types ayant un déterminant commun "a". Ce dernier est classiquement situé entre les positions 124 et 147 au sein de la région hydrophile majeure (résidus 100–170), exposée à la surface des virions (Roque-Afonso et al 2005), et il est commun à toutes les souches, donc spécifique de groupe. S'ajoutent à cela deux paires de déterminants de sous-type, exclusifs en principe l'un de l'autre: d/y et w/r. on obtient quatre molécules différentes: adw, adr,

ayw, ayr, et à l'intérieure même du déterminant w; il existe des variations phénotypiques ou de sous groupes: w1, w2, w3 et w4.

La protéine pré S2 est constituée de 55 acides aminés et forme avec l'Ag HBs la protéine moyenne (protéine M) de l'enveloppe du VHB (281 aa). Quant à la protéine pré S1 elle est de longueur variable et constitue avec l'Ag HBs et la protéine pré S2 la grande protéine de l'enveloppe ou la protéine L (figure 8).

Les trois protéines d'enveloppe sont présentes en quantités différentes à la surface des particules virales avec prédominance de la protéine S. La protéine moyenne (M) est un composant mineur des trois types de particules virales; elle est présente à un taux d'environ 10%, alors que la grande protéine est abondante dans les filaments (10%) et les virions (25%), mais rare dans les sphères (1%) (Mahoney 1999, Roingeard 1997). 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, permet 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 (Dubois et al 1998).

c.2. L'antigène HBc et l'antigène HBe

c.2.1. L'antigène HBc

La protéine « core » ou antigène HBc (AgHBc) est la protéine structurale majeure de la capside, c'est une protéine de 183-185 a.a, avec un poids moléculaire apparent de 22 kDa. Elle possède une extrémité C-terminale basique permettant sa liaison à l'ADN (Gallina et al 1989). Les protéines HBc sont capables de s'organiser spontanément pour former une capside, même en absence d'ARN pré-génome.

L'antigène HBc est exprimé à la surface des hépatocytes où il induit des réactions de cytolyse de la part des lymphocytes T CD8+. Cependant, contrairement à l'antigène HBs, il n'apparaît pas dans le sérum.

c.2.2. L'antigène HBe

La protéine « pré-core » ou antigène HBe (AgHBe) proprement dit est une protéine de 17 kDa, détectée dans le sérum des patients infectés par le VHB lorsque celui-ci se multiplie. Cette protéine n'est nécessaire ni au pouvoir infectieux du virus ni à sa multiplication (Messageot et al 2001, Tong et al 1990), puisqu'il existe des virus incapables de la synthétiser.

Plus petit que l'antigène HBc, l'AgHBe est aussi codé par le gène C, mais il lui manque 34 à 36 acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale de l'antigène HBc et il a, à l'opposé, 10 acides aminés de la région pré-C qui manquent à l'antigène HBc (Hadziyannis et al 2001). Cette séquence supplémentaire est un peptide signal qui rend compte du passage de l'antigène HBe dans le système réticulo-endothélial et de son excrétion dans le sérum (Wang et al 1991). On peut donc conclure que HBe est synthétisé sous la forme d'un précurseur (protéine de capsid) qui subira une maturation protéolytique avant d'être sécrété. L'antigène HBe est aussi présent dans le core du virus et on ne le détecte que lorsque le sérum contient de l'AgHBs.

c.3. L'ADN polymérase

L'ADN polymérase codée par le cadre de lecture P est une protéine d'environ 850 acides aminés, elle possède plusieurs fonctions : une fonction d'ADN polymérase ADN-dépendante, une fonction de transcriptase inverse (ADN polymérase ARN-dépendante) et en fin une activité RNase H.

La polymérase possède 3 domaines fonctionnels impliqués dans la réplication et un domaine non essentiel : (figure 10)

- l'extrémité N-terminale ou TP (Terminal Protein) permet la liaison covalente de la protéine avec l'extrémité 5' du brin (-) d'ADN (Zoulim et al 1994).
- le domaine SPACER n'est pas indispensable aux activités de la polymérase car l'introduction de substitutions, délétions et insertions dans cette région n'affecte en rien son fonctionnement (Radziwill et al 1990).
- la région ADN polymérase / transcriptase inverse contient un motif peptidique (YMDD) important pour l'activité de transcription inverse (Stuyver et al 2001). Le domaine RT est divisé en au moins 5 sous-domaines désignés de A à E.
- Le domaine « RNaseH » possède une activité enzymatique de type RNaseH, c'est-à-dire qu'il est capable de digérer l'ARN pré-génome lors de la synthèse du brin (-) de l'ADN viral (Radziwill et al 1990, Stuyver et al 2001, Halfon et al 2003).

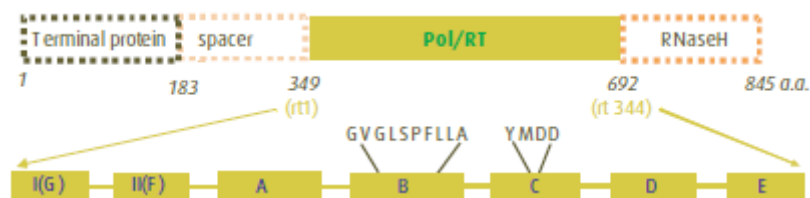


Figure 10: Représentation schématique de la structure de l'ADN polymérase du VHB (Zoulim et al 2006)

c.4. La protéine X

Le gène X code pour une protéine multifonctionnelle de 145 à 154 acides aminés, selon le sous type. La protéine X est dotée d'une faible activité oncogénique, et elle joue un rôle clé dans l'activation de l'expression des gènes du VHB, ainsi que la réplication virale en agissant comme un coactivateur transcriptionnel collaborant avec des facteurs de transcription cellulaire (Kim et al 2008, Wei et al 2010). La

protéine X pourrait avoir des implications importantes en ce qui concerne le pouvoir évolutif de certaines infections à VHB, le passage à la chronicité, voire l'évolution vers le carcinome hépatocellulaire (Zoulim et al 1991).

3. Réplication du Virus de l'hépatite B

La réplication virale, élément capital dans la décision thérapeutique pour l'hépatite B (Wagner et al 2004) se caractérise par la positivité de l'ADN du virus. Les cellules permissives sont les hépatocytes, bien que de l'ADN viral ait été trouvé en faible quantité dans des sites extra hépatiques, monocytes, lymphocytes B, lymphocytes T CD4+ et CD8+. C'est sans doute à mettre en rapport avec les réinfections du greffon, observées après transplantation de foie, en particulier chez les patients atteints d'hépatite chronique sévère.

Le cycle d'infection par le VHB comporte deux phases:

- Phase de réplication complète, qui se déroule dans les cellules hépatiques avec libération de virion dans le sérum. Elle se traduit par une double antigénémie AgHBs et AgHBe. A cette phase ; le sujet atteint est très contaminant.
- Phase de réplication incomplète ou phase d'intégration ; au cours de laquelle l'ADN du virus s'intègre à l'ADN chromosomique hépatocytaire, une recombinaison génétique est alors réalisée avec reprogrammation des hépatocytes qui deviennent capables de produire l'AgHBs. Cette phase ne s'accompagne plus de production de virion complet ni de l'expression d'AgHBe/c sur les membranes hépatocytaires ; donc l'infection est absente.

La multiplication du VHB (Dubois et al 1998)(figure 11), commence par L'attachement du virus sur la cellule cible (hépatocyte), et la fixation se fait par interaction entre l'antigène préS1 côté virus et par l'albumine humaine polymérisée

côté hépatocyte. La nature du récepteur de l'HBV n'est, toutefois, pas encore déterminée (Le Duff et al 2009).

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

Dans le noyau, l'ADN polymérase virale associée au virion ; complète l'ADN génomique partiellement bicaténaire en ADN bicaténaire circulaire sur-enroulé appelée ADNccc. Celui-ci est transcript par l'appareillage cellulaire en ARN messagers, traduits en 4 protéines (AgHBs, AgHBc, ADN polymérase et protéine X), et en ARN prégénomique, particularité de l'HBV, qui est rétrotranscript par l'ADN polymérase en nouvel ADN génomique.

L'encapsidation s'effectue dans le cytoplasme et seul l'ARN prégénomique, associé à la polymérase P, est encapsidé car il est le seul à posséder le signal d'encapsidation. L'ARN prégénomique est copié en un ADN (-) de 3182 nucléotides, grâce à la transcriptase inverse virale, La synthèse du second brin d'ADN (+), à partir du brin néo-synthétisé s'interrompt prématurément donnant des brins courts, de tailles variables.

La nucléocapside acquiert ensuite son enveloppe. Cette étape se passe dans un compartiment prégolgien (post-réticulum endoplasmique) correspondant au site de maturation des protéines d'enveloppe. Le virion ainsi formé par bourgeonnement de la membrane du Réticulum Endoplasmique (RE) est libéré dans la voie exocytique.

Certaines nucléocapsides ne sont pas enveloppées et retournent dans le noyau, avec libération du génome viral et redémarrage d'un nouveau cycle de multiplication transcript (Werle et al 2001). Cette étape permet le maintien d'un "pool" d'ADNccc dans le noyau de l'hépatocyte, ce qui rend difficile l'élimination totale du virus par les traitements antiviraux.

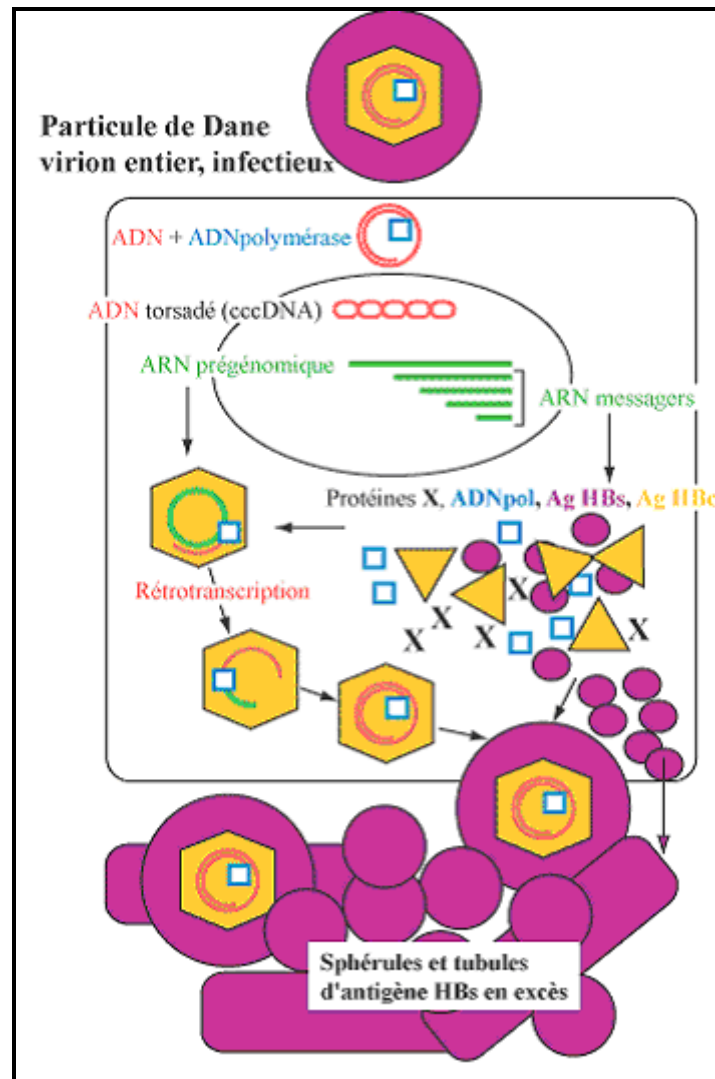


Figure 11: Schémas illustrant la multiplication du VHB dans l'hépatocyte (Huraux 2007)

Le cycle de réplication des hépadnavirus fait intervenir une transcriptase inverse, qui ne possède pas d'activité 3' 5' exonucléasique et ne corrige donc pas ses erreurs de transcription. Le taux d'erreur de cette enzyme, favorisé par l'important niveau de production du VHB (environ 10^{11} virions par jour), est estimé à 10^{10} paires de bases par jours (Wagner et al 2004).

4. Variabilité du génome du VHB

Le VHB est caractérisé par une hétérogénéité génomique générée par les erreurs de la transcriptase inverse virale, par un niveau de réplication très important

et par la persistance du virus sous forme d'ADN superenroulé (ADNccc) dans le noyau des hépatocytes (Ducancelle et al 2011).

La majorité des variants du VHB sont défectifs et ne peuvent se multiplier. Cependant, Il arrive que certaines mutations influencent peu la biologie du virus et aboutissent à l'émergence de variants dont la séquence ne diffère que légèrement de celle de la population majoritaire ("souche sauvage"). Ces "quasi –espèces" coexistent avec la souche sauvage et sont dans un état d'équilibre, mais leur composition peut être changée par toute modification de leur environnement. Généralement moins viables que la souche sauvage, ces variants ne peuvent évoluer en population majoritaire ou significative qu'en présence d'une pression sélective qui défavorise la souche sauvage.

Les patients contaminés chroniques par le VHB sont infectés par plusieurs quasi-espèces, avec la présence simultanée de la population prédominante correspondant à la souche sauvage et d'autres variants génétiquement distincts. Le terme « variants génotypiques» est généralement utilisé pour désigner les souches de la variabilité génomique spontanée qui apparaissent en l'absence de pression de sélection connue, alors que le terme « mutants » serait plus adapté aux souches qui émergent sous pression de sélection telle que la vaccination ou le traitement viral (Ajana 2006).

a. Variants génotypique du VHB

La variabilité génotypique est stable et reflète l'évolution des hépadnavirus. Elle fut d'abord évaluée par sérotypage, et les souches de VHB étaient classées en "sérotypes" ou "sous-types". Cette classification était essentiellement utilisée pour des études épidémiologiques, elle est basée sur l'hétérogénéité de l'Ag HBs au niveau de la boucle antigénique majeure ou "major hydrophilic loop (MHL), définie

entre les acides aminés 100 et 160 (Linda et al 1998, Lieven et al 2000, Kramvis et al 2005).

Trois déterminants antigéniques majeurs ont été établis :

- Le déterminant “a” est commun à presque toutes les souches de VHB et il est composé d'épitopes immunodominants situés entre les résidus 124 et 147 de la MHL.
- Les déterminants “d/y” et “r/w” qui sont mutuellement exclusifs (c'est-à-dire qu'un AgHBs de sous-type “d” ne peut pas être aussi de sous-type “y” comme un AgHBs de sous-type “r” ne peut être aussi “w”). La présence d'une Lysine ou d'une Arginine en position 122 ou 160 détermine respectivement les sous-types “d/y” et “r/w” (tableau 2).

Résidu 122	Résidu 160	
Lys	Lys	Arg
	dw	dr
Arg	yw	yr

Tableau 2: Résidus impliqués dans les déterminants "d/y" et "r/w" de l'AgHBs (Wagner et al 2004)

D'autres déterminants mineurs localisés aux positions 127, 144, 145, 158, 159, 177 et 178 ont été identifiés et, au total, 9 sous-types différents ont été définis : ayw1 à 4, ayr, adw2, adw4, adrq- et adrq+.

Une nouvelle classification dite génotypique a été établie, elle est fondée sur la comparaison des séquences nucléotidiques des souches de VHB, et prend en compte la totalité du patrimoine génétique. Cette classification fait actuellement état de 8 génotypes, de A à H (tableau 3). Deux autres types génomiques I et J, ont récemment été assignés (Désiré et al 2011). La divergence intergroupe doit être d'au

moins 8% dans tout le génome, et d'au moins 4.1 % dans le gène S (Roque-Afonso et al 2005).

Bien qu'il existe une certaine corrélation entre sérotypes et génotypes, elle est loin d'être parfaite (tableau 3).

Génotype	Sérotipe	Génome (nt)	PréS1/PréS2/S (aa)
A	<i>adw2 ayw1^a</i>	3221	400
B	<i>adw2 ayw1</i>	3215	400
C	<i>adr, ayr, adrq-</i>	3215	400
D	<i>ayw2, 3 et 4</i>	3182	389
E	<i>ayw4 adw2^a</i>	3212	399
F	<i>adw4</i>	3215	400
G	<i>adw2</i>	3248	399
H	<i>adw4</i>	3215	400

Tableau 3: Les génotypes du VHB (Wagner et al 204)

b. Mutants du VHB

b.1. Mutations au niveau du gène S

Dans le génome viral du VHB, la région S est subdivisée en régions S, préS1 et préS2 qui codent pour les protéines de l'enveloppe virale (Ag HBs, protéine pré S1 et protéine pré S2).

Les mutants affectant l'AgHBs sont souvent appelés "mutants d'échappement à la vaccination". Ils sont responsables de phénomènes d'échappements à la vaccination, et à la sérothérapie préventive utilisée pour éviter l'infection du greffon chez les transplantés de foie (Ozaslan et al 2007, Émile 2009).

L'AgHBs du premier mutant du VHB identifié possédait à la position 145 une substitution d'un résidu glycine par un résidu arginine (G145R). Ce mutant est aujourd'hui le mutant d'échappement le plus fréquent, même si d'autres ont été identifiés depuis (tableau 4).

Position	Résidu normal	Mutant
120	Pro	Ser
126	Ile/Thr	Asn/Ala/Ser
129	Gln	His
133	Met	Leu
144	Asp	Ala
145	Gly	Arg
159	Ala	Val
183	Phe	Cys

Tableau 4: Mutants de l'AgHBs échappant à la vaccination (Wagner et al 204)

Les mutations affectant les protéines pré S1 et pré S2 sont généralement des délétions. Une mutation modifiant le codon initiateur de la protéine préS2, et éliminant donc l'expression de cette protéine, a été décrite (François et al 2001).

b.2. Les mutants "précore" ou pré-C, au niveau du gène C

La région C se compose de deux séquences dénommées respectivement pré-C et C. L'extrémité 3' du gène C code pour la protéine de capsid (Ag HBc). Les deux séquences pré-C et C sont nécessaires pour la synthèse de la protéine Ag HBe (Li et al 1993). En effet, Les premiers nucléotides de la région pré-C codent pour 19 acides aminés qui correspondent à un peptide signal facilitant la sécrétion de l'antigène Hbe dans le sérum après passage dans le réticulum endoplasmique cellulaire.

Étant donné qu'il n'y a pas de chevauchement d'une grande partie du cadre de lecture ouvert (ORF) de la région pré-core/core par un autre ORF (figure 9), il peut se produire plus de mutations du génome viral dans cette région. La mutation la plus courante et la plus souvent étudiée est la substitution de la guanine (G) par l'adénine (A) au niveau du gène pré-C (en position 1896). Cette mutation transforme le codon 28 de TGG en un codon stop TAG, qui termine la transcription à cet endroit entraînant un arrêt de lecture et l'arrêt de l'expression de l'AgHBe. En revanche, la protéine de capsid peut toujours être synthétisée et donc la réplication virale peut se poursuivre (Lebarbier et al 2004, Bourlière 2005).

Les personnes infectées sont donc AgHBe négatifs mais continuent à répliquer activement ce virus à mutation pré-C, avec une abondance d'ADN viral dans le sérum, et donc une évolution possible vers l'hépatite fulminante ou vers une hépatite chronique sévère, répondant mal à l'interféron. Dans ces cas, une recherche d'AgHBe négative chez un malade ne signifie pas qu'il est guéri et cette recherche ne peut être utilisée comme marqueur pour suivre l'évolution de la maladie (Ratziu et al 2002).

Cette même mutation apporte une plus grande stabilité au génome viral, étant donné que le site nucléotidique 1896 qui est maintenant occupé par A se fixe plus

avidement au nucléotide T correspondant à la position 1858, ce qui assure une plus grande stabilité, une encapsulation prégénomique et l'initiation de la synthèse de l'ADN.

Les autres mutations les plus communément décrites sont la transversion A à T en position 1762 et la transition G à A en position 1764 situées dans la région du promoteur basal du core (BCP). Ces mutations entraînent une altération de la production de l'AgHBe au niveau transcriptionnel (Lebarbier et al 2004).

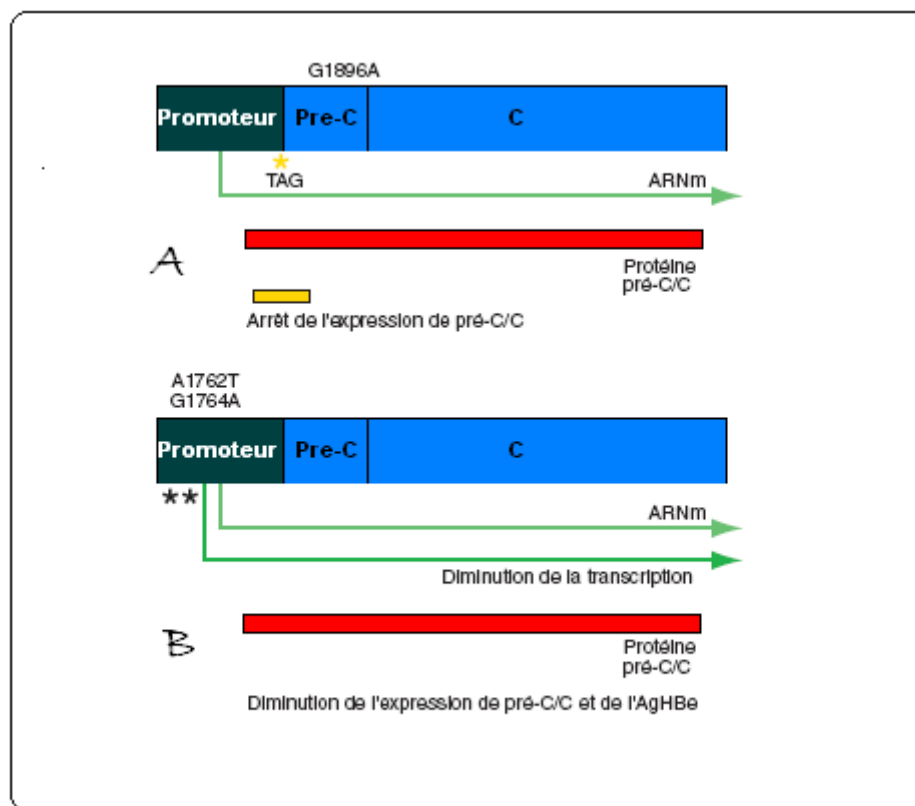


Figure 12: Mutants pré-core du virus de l'hépatite B

(A. Mutants de la région pré-core. B. Mutants du promoteur du core).

b.3. Mutations du gène de la polymérase virale

Le plus souvent, les mutations décrites touchent le site catalytique de transcriptase inverse, en particulier le motif peptidique YMDD (résidus 551 à 554) du domaine C de la polymérase virale (figure 10). Ces mutations sont sélectionnées par

les traitements antiviraux de type analogues nucléosidiques tels que la lamivudine (LAM) et le famciclovir.

Du point de vue de la nomenclature, les mutations sont identifiées et nommées en désignant la région de la mutation, l'acide aminé original, sa position relative au début de la région et l'acide aminé muté (Stuyver et al 2001). Par exemple, la mutation rtM204I décrit une mutation de la rt avec en position 204 un remplacement de la méthionine par l'isoleucine.

Les mutations les plus fréquemment à l'origine d'une résistance à la LAM affectent le centre catalytique de la rt (domaine C: YMDD) entraînant le remplacement de la méthionine en position 204 par une valine, isoleucine ou sérine (rtM204V, rtM204I, rtM204S) (figure 13). Souvent, une mutation au sein de la rt induit de manière transitoire une diminution du pouvoir de réplication viral. De telles mutations sont alors accompagnées par des mutations compensatrices qui restaurent une réplication virale efficace. Pour la résistance à la LAM, la mutation compensatrice la plus reconnue est rtL180M qui se trouve dans le domaine conservé B. Seule, cette mutation n'induit pas de résistance virale à la LAM. Si la mutation rtM204I peut être isolée, les mutations rtM204V et rtM204S sont toujours associées à d'autres mutations compensatrices de type rtL180M ou rtV173L.

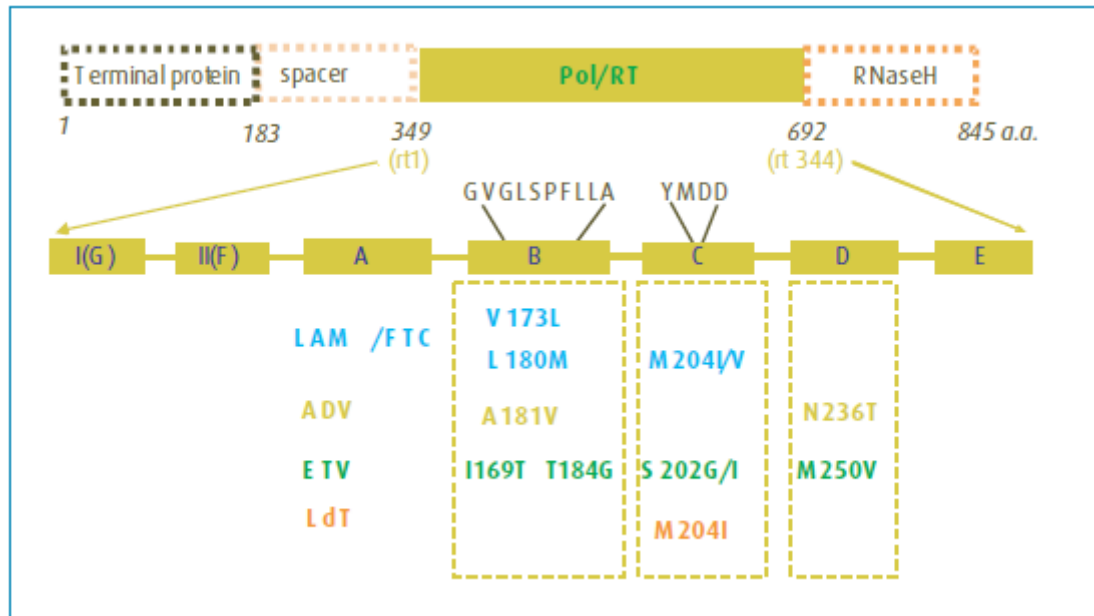


Figure 13: Les principales mutations du gène de la polymérase virale responsable de résistance aux antiviraux (LAM : lamivudine, ADV : Adéfovir, ETV : Entécavir, LdT : Telbivudine) (Zoulim et al 2006).

b.4. Mutation au niveau du gène X

Des études de mutation de ce gène ont montré que la protéine X interagit avec plusieurs systèmes de signalisation intra-cellulaire et possède un rôle anti-apoptotique.

Il a été suggéré que certaines mutations dans le gène X pourraient jouer un rôle dans la transformation cellulaire (Rosmorduc et al 1999). Enfin une corrélation entre le type de mutation du gène X et l'état clinique des patients atteints d'une hépatite B chronique a été récemment décrite (Eun Young et al 2011).

C. Réponse immunitaire liée à l'infection par le VHB

L'infection humaine par le virus de l'hépatite B est associée à une première phase d'incubation (de 4 à 12 semaines) durant laquelle le virus atteindra les hépatocytes, puis une phase de réplication et de production virales qui conduisent, sans atteinte de l'intégrité cellulaire, à la libération de particules virales dans la circulation sanguine. Chez l'adulte, une réponse immune adaptée mettra un terme à

la réplication virale dans plus de 90 % des cas alors que l'infection dans l'enfance sera fréquemment associée à un portage chronique du VHB (Thibault 2001).

Le VHB n'est pas cytopathique, c'est la réponse cellulaire dirigée contre les antigènes viraux exprimés à la membrane qui est responsable de la nécrose cellulaire et de l'inflammation. Les lésions histologiques sont, donc, dues à une réponse immunitaire de l'hôte vis à vis des cellules hépatiques infectées et à une réponse inflammatoire non spécifique. La réponse immunitaire cellulaire contribue également à la clairance du virus. Ces deux fonctions opposées sont attribuées aux mêmes cellules.

Lors de l'infection aiguë résolutive, les réponses cellulaires T cytotoxiques et T auxiliaires sont puissantes, polyclonales et spécifiques de la majorité des protéines virales (enveloppe, nucléocapside et polymérase). Au contraire, lors de l'infection chronique cette réponse est faible, de spécificité plus restreinte et difficilement détectable en périphérie.

Les cellules T CD8⁺ spécifiques ont la capacité de détruire les hépatocytes infectés mais également d'éliminer le virus en inhibant sa réplication via la sécrétion de cytokines de type Th1 comme l'interféron gamma. Par contre, lors de l'infection chronique, contrairement à ce que l'on observe lors de l'infection aiguë, la production de cytokines nécessaires au contrôle viral par les lymphocytes T stimulés par l'antigène, est faible ou absente (Bourlière et al 2008).

La gravité des lésions hépatiques varie selon le statut immunitaire: une réponse immunitaire adaptée entraîne la nécrose des hépatocytes infectés et l'élimination du virus (hépatite aiguë bénigne), une réponse immunitaire trop forte induit une destruction hépatocytaire massive (hépatite aiguë fulminante), l'immunotolérance est marquée par une multiplication virale abondante mais asymptomatique sans atteinte

hépatocytaire ; et enfin lors d'un portage chronique du virus avec hépatite chronique; la réponse immunitaire existe mais, elle est insuffisante pour éliminer le virus.

D. Epidémiologie du VHB

L'hépatite B représente la principale cause de pathologie hépatique aiguë ou chronique dans le monde, comme par exemple les cirrhoses ou le carcinome hépatocellulaire. L'OMS estime à deux milliards le nombre de personnes ayant été exposées à ce virus, soit une personne sur trois, et près de 10 à 30 millions de nouvelles contaminations par an. Le nombre de porteurs chroniques est estimé à plus de 350 millions, avec près de 1 million de décès chaque année (Zanetti et al 2005, Muszlak et al 2007).

La prévalence du VHB est donc de 5,4 % à l'échelle mondiale, contre 1 % pour celle du VIH et 3 % pour celle du virus de l'hépatite C (Flash Info 2006).

1. Séro-épidémiologie

L'infection par l'HBV est mondialement répandue mais répartie de façon irrégulière, délimitant trois catégories de zones géographiques: (Hou et al 2005, Rizzetto et al 2008, Read et al 2008, Leggat et al 2009)

- Les zones de forte endémicité (> 8 % de la population générale est infectée de manière chronique), sont essentiellement les pays en voie de développement telles l'Afrique sub-saharienne, l'Asie du Sud-Est, l'Extrême-Orient. la transmission s'effectue le plus souvent par voie verticale (de la mère à l'enfant, en Asie principalement) mais aussi de façon horizontale (d'enfant à enfant, en Afrique Noire principalement). La dissémination intrafamiliale du virus est le plus souvent aggravée par les mauvaises conditions d'hygiène et la promiscuité importante.

- Les zones d'endémicité intermédiaire (2 à 8% de la population est infectée de manière chronique), recouvrent le pourtour méditerranéen, l'Europe de l'Est et l'Amérique Latine. La transmission est surtout horizontale.
- Les zones de faible endémicité (<2% de la population est atteinte d'infection chronique), Elles sont représentées essentiellement par l'Europe de l'Ouest, l'Amérique du Nord et le Japon. Dans ces pays l'infection virale n'est pas endémique et se transmet principalement par les rapports sexuels et les toxicomanies (Liaw et al 2009).

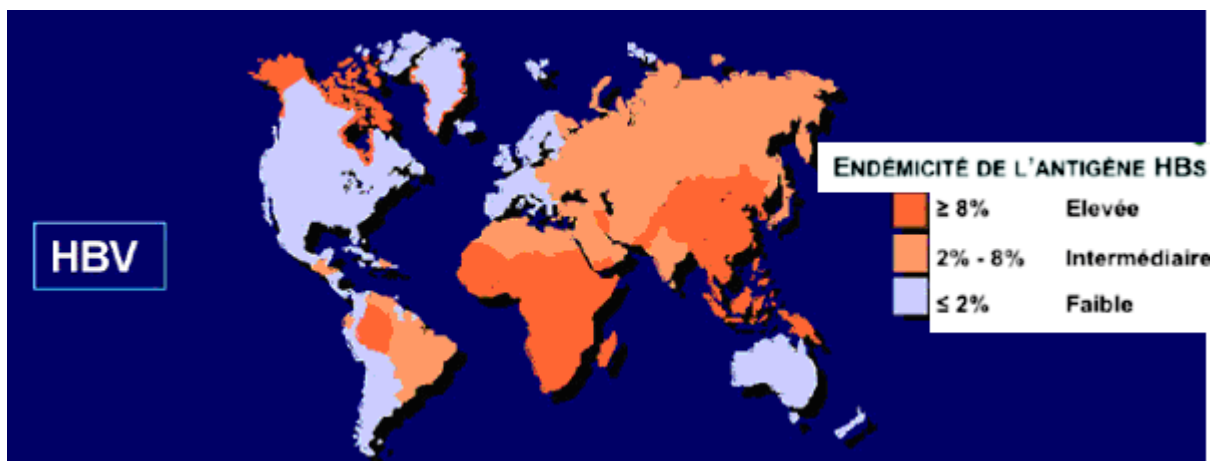


Figure 14: Distribution géographique de l'HBV dans le monde (Kew 2010)

2. Epidémiologie moléculaire

Neuf sous-types sont définis pour l'antigène HBs: adw2, adw4, adrq+, adrq-, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4 et ayr (Linda et al 1998, Lieven et al 2000, Kramvis et al 2005). Ils sont de répartition géographique distincte. Par exemple, adw prédomine dans le Nord de l'Europe, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud, en Australie, tandis que ayr se rencontre dans le Nord et l'Est de l'Afrique, l'Est de la

Méditerranée, l'Est de l'Europe, le Nord et le Centre de l'Asie, l'Inde (Messageot et al 2001).

La variabilité du génome du VHB a permis de classer la population du VHB humaine en génotypes dont la répartition à travers le monde est ubiquitaire. Ils ont été déterminés, dans la plupart des cas, à partir de la région prés2. Actuellement huit génotypes sont identifiés, représentés de A à H (Campos et al 2005, Ajana 2006, Fattovich et al 2008, Khan et al 2008). Comme le montre la *figure 15*, ces différents génotypes présentent une distribution géographique distincte ; par exemple, le génotype E prédomine en Afrique et le génotype B en Asie du Sud-Est alors que le génotype D est majoritairement dominant dans le bassin méditerranéen.

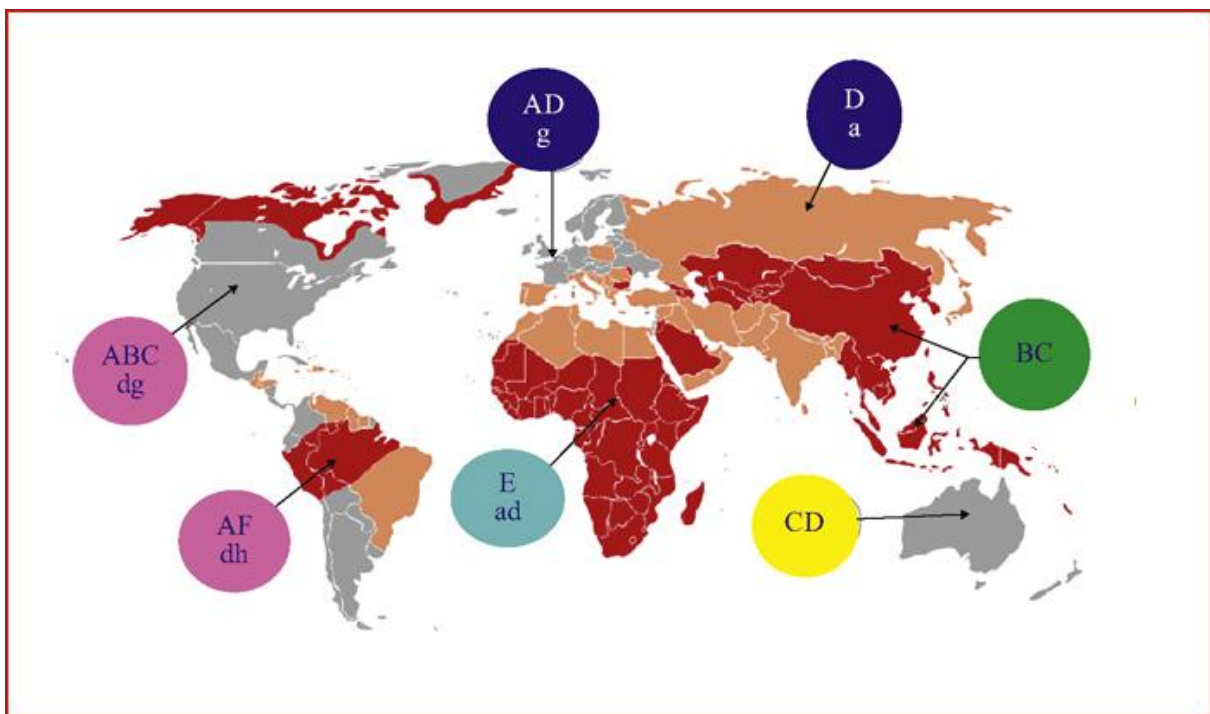


Figure 15 : Répartition géographique des génotypes du virus de l'hépatite B dans le monde (Ducancelle et al 2011)

Néanmoins, 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 %

Quant aux mutants pré-core, Leur distribution est ubiquitaire et particulièrement fréquente à travers le monde avec une prévalence de 7 à 30 % des malades porteurs d'infection chronique par le VHB. Ces mutants sont essentiellement trouvés en Méditerranée avec une prévalence de 50 à 80 % et en Asie avec une prévalence de 40 à 55 %, Leur distribution semble intimement liée à celle des différents génotypes existants dans les différents continents (Halfon et al 2002).

E. Transmission et facteurs de risque du VHB

Le virus de l'hépatite B est un virus extrêmement contagieux, il est cent fois plus contagieux que le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine), et peut rester stable à 25°C pendant sept jours dans du sang séché. Le HBV est effectivement très résistant puisque ni l'alcool ni l'éther ne le détruisent, pour l'inactiver dans le sérum il faut une concentration d'hypochlorite de soude de 5 % (eau de Javel pure), alors que d'habitude la plupart des virus sont détruits par l'hypochlorite de soude à 0,5 %. Le HBV se conserve au moins 20 ans au congélateur à -20°C, supportant très bien les cycles de congélation-décongélation. Des sérums laissés 6 mois à 30-32° C restent infectieux (Buffet 2003, Flash Info 2006).

Le HBV se transmet par effraction cutanée ou par contact des muqueuses avec du sang ou d'autres liquides organiques contaminés (Sulkowski 2008). Les concentrations les plus élevées du virus se retrouvent dans le sang et les lésions suintantes, alors qu'on relève des concentrations modérées dans le sperme et les sécrétions vaginales et des concentrations plus faibles dans la salive. Le HBV ne se transmet pas par l'air, l'eau ou les aliments (OMS 2001).

Les principales voies de transmission sont :

- Transmission par voie parentérale.
- Transmission de personne à personne.
- Transmission de la mère à l'enfant au cours de la période périnatale.

1. Transmission parentérale

Le virus de l'hépatite B peut être transmis par transfusion de sang ou de produits sanguins provenant de porteurs de l'HBV ; surtout après transfusions répétées. Mais, cette transmission est devenue rare depuis l'introduction obligatoire du dépistage de l'Ag HBs dans le sang des donneurs en 1971. Le très faible taux du risque transfusionnel rencontré actuellement, pourrait être dû soit à une transmission pendant la fenêtre sérologique au cours d'une infection aiguë, soit à une transmission par des individus porteurs chroniques du virus sans antigène HBs détectable par certaines techniques (Hillaire 2006, Niederhausera et al 2008).

La transmission parentérale est aussi représentée par la toxicomanie par voie veineuse qui est actuellement l'un des modes principaux de transmission du VHB, ainsi que la manipulation par le personnel soignant de seringues, aiguilles ou autres instruments ayant pu être contaminés et mal stérilisés, sans oublier toutes les interventions chirurgicales même sans transfusion de sang (Thibault 2001), interventions dentaires, examens médicaux exigeant un cathéter, acupuncture, tatouage et " body piercing " (Ajana 2006).

2. Transmission de personne à personne

La contagiosité de l'HBV est liée à la présence du virus dans la plupart des liquides biologiques, notamment salive (Hui et al 2005) et sécrétions génitales (Sifer et al 2003), et ce à des titres infectieux souvent très élevés, pouvant atteindre 10^9 virus/ml (Kammerlander et al 1998). Le virus peut par exemple se transmettre si la

salive entre en contact avec le sang lors de lésions cutanées, ou après rapports sexuels non protégés. L'hépatite B est ainsi la maladie sexuellement transmissible la plus fréquente.

Etant donnée la résistance du virus en milieu extérieur, les transmissions intra-familiales sont assez fréquentes et favorisées dans des situations aussi bénignes que l'échange de coupe ongles, de brosses à dents ou de rasoirs.

Il faut noter que La transmission de l' HBV d'un enfant à un autre est le cas le plus fréquent. Cette transmission se produit habituellement à domicile, mais aussi dans les crèches et à l'école. Elle résulte le plus souvent du contact de lésions cutanées ou de muqueuses avec du sang ou des sécrétions de plaies. Le virus peut également être transmis par contact avec la salive à la suite de morsures ou autres effractions cutanées et à la suite de la prémastication des aliments. En outre, le virus peut être transmis par des objets, comme des serviettes ou des brosses à dents partagées, car il peut survivre au moins sept jours hors de l'organisme et se déposer en forte concentration sur les objets, même en l'absence de sang visible (OMS 2001).

3. Transmission périnatale

Le principal mode de contamination de l'enfant se fait par transmission verticale au moment de l'accouchement par microtransfusions materno-fœtales, ou par contact avec des liquides biologiques porteurs de virus. La transmission in utero est très rare, hormis dans le contexte d'une infection aiguë de la mère au cours du troisième trimestre, mais quand elle existe elle se ferait selon deux modes : par voie hématogène par infection des cellules endothéliales des capillaires du placenta, ce qui représenterait le principal risque de transmission intra-utérine, ou par voie

cellulaire par transmission transplacentaire de cellule à cellule (Ranger-Rogez et al 2002).

F. Histoire naturelle de l'infection par le VHB et signes cliniques

Lorsqu'un sujet entre en contact avec le virus de l'hépatite B, il est soumis à un double risque, celui de survenue d'une hépatite fulminante et celui d'évolution vers la chronicité.

1. Hépatite aiguë

Après une incubation variant de 10 semaines à 6 mois l'infection par le VHB entraîne une hépatite aiguë (Émile 2009). Les formes asymptomatiques de l'infection à VHB sont les plus fréquentes et représentent 70 % des hépatites B, cependant, l'absence de symptômes n'empêche pas le virus de s'attaquer au foie. La forme symptomatique de l'hépatite aiguë se caractérise par un ictère, une grande fatigue (asthénie), une perte d'appétit (anorexie), des nausées et parfois de la fièvre, ainsi que des taux très élevés de transaminases sériques (Pol, 2006).

La proportion de cas symptomatiques de l'hépatite aiguë B augmente avec l'âge, alors que le risque de passage à une infection chronique diminue. En effet, lorsqu'elle a lieu à la naissance ou durant la petite enfance, l'infection par le VHB entraîne en règle générale une hépatite aiguë asymptomatique mais associée à un risque élevé (de 90 % à la naissance à 30 % à quatre ans) d'évolution vers une infection chronique. Inversement, lorsqu'elle a lieu après cinq ans, l'infection par le VHB peut entraîner une hépatite aiguë symptomatique et elle est associée à un risque faible d'évolution vers une infection chronique (5%) (Asselah et al 2008).

Passée la phase aiguë, 90 à 95 % des patients connaissent une guérison spontanée (Pol 2006).

2. Hépatite fulminante

La gravité immédiate de l'hépatite B aiguë est liée au risque d'hépatite fulminante qui est de l'ordre de 1% des formes symptomatiques (Pol 2006). Elle est définie par l'apparition d'une encéphalopathie hépatique associée à une diminution du facteur V, le patient sombre dans le coma, présente des hémorragies cutanées et des muqueuses, et une forte hypoglycémie. Sans une transplantation hépatique rapide, quatre malades sur cinq décèdent en quelques jours, voire en quelques heures. Pour ceux qui en guérissent, il n'y a en général aucune séquelle (Flash Info 2006).

3. Hépatite chronique

Cinq à dix pour cent des sujets contaminés deviennent des porteurs chroniques du virus de l'hépatite B. L'infection chronique du VHB est définie par une élévation chronique des transaminases; observée classiquement 6 mois après l'épisode d'hépatite aiguë, par une persistance de l'antigène HBs et d'ADN viral détectable dans le sérum avec présence d'antigène HBe, ainsi que par des données histologiques.

Le portage chronique évolue sur plusieurs décennies, trois phases distinctes ont été décrites (Asselah et al 2008, Émile 2009)

- Une première phase dite d'immuno-tolérance (le virus est toléré par l'organisme), caractérisée par une réplication intense du virus, une normalité ou la quasi-normalité des transaminases et des lésions histologiques hépatiques de nécrose et d'inflammation absentes ou minimales.
- Une seconde phase dite de «clairance immunitaire» caractérisée par une réplication moins importante du virus mais des lésions histologiques importantes, actives, s'accompagnant d'une élévation importante et chronique des transaminases.

➤ Une troisième phase dite «faible réplication» correspond au statut de «porteur inactif de l'Ag HBs». Elle se détermine par la présence de l'Ag HBs, et par la survenue d'une rémission spontanée avec une réplication virale faible ou absente suivie dans le cas du virus «sauvage» de la perte de l'AgHBe, de l'apparition de l'anti-HBe et de la normalisation des transaminases, aboutissant à un portage inactif du virus avec des anomalies des lésions histologiques caractérisées le plus souvent par une cirrhose non active.

Le tableau suivant résume les principaux profils observés lors d'une infection par le VHB.

Ag HBs	Anticorps anti-HBs	Ag HBe	Anticorps anti-HBe	Anticorps Anti-HBc	ADN HBV	Interprétation
+	-	+	-	+ (IgM)	+	Hépatite aiguë
-	+	-	+	+ (IgG)	-	Hépatite aiguë guérie
+	-	-	+	+	-	Porteur inactif de l'Ag HBS
+	-	+	-	+	+	Hépatite chronique (virus sauvage)
+	-	-	+	+	+	Hépatite chronique (mutant pré-C)
+	-	+	-	+	+	Cirrhose active
+/-	+/-	-	+	+	-	Cirrhose inactive

Tableau 5 : Principaux profils observés dans différentes situations cliniques au cours de l'infection par le VHB (Pol 2006).

À tout moment, les réactivations virales sont possibles (chez les porteurs chroniques et chez les porteurs inactifs) : la réplication virale redémarre, les ALAT (Alanine Amino Transférase) s'élèvent, l'Ag HBe réapparaît chez des sujets qui étaient Ag HBe négatifs. Les réactivations virales sont spontanées ou iatrogènes, survenant après traitement cytotoxique ou immunosuppresseur (corticoïdes, rituximab, infliximab...) ces épisodes de réactivation peuvent évoluer vers une cirrhose ou un cancer du foie (Émile 2008).

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

Le virus de l'hépatite B est responsable de la première maladie virale chronique. Chez l'adulte, il est à l'origine d'hépatites aiguës, parfois fulminantes, mais aussi de

formes chroniques pouvant évoluer vers la cirrhose (20% des hépatites chroniques) et le cancer du foie (CHC) (Chemin et al 2009), ce qui est prouvé par plusieurs études épidémiologiques qui ont montré une superposition entre les zones de forte prévalence du carcinome hépatocellulaire et celles où le VHB est présent (Buffet 2003).

Le risque de développer un carcinome hépatocellulaire est de l'ordre de 20% chez les patients cirrhotiques soit un effectif de 3 à 5 % par an. Il arrive que le VHB induise un carcinome sans cirrhose préalable, mais cette situation est très rare. Dans ces cas, la seule issue est alors la transplantation hépatique. Le taux de charge virale, à savoir la quantité de virus dans le sang, ainsi que l'ancienneté de la contamination sont deux facteurs prédictifs de l'évolution vers une chronicisation, et donc du développement d'une cirrhose ou d'un cancer (Flash Info 2006).

Comme d'autres cancers, le CHC résulte d'un processus multifactoriel impliquant des facteurs à la fois d'environnement et de l'hôte. Le virus de l'hépatite B n'étant à priori pas directement oncogène ; des éléments péjoratifs d'évolution ont été déterminés : âge, sexe, tabagisme, consommation d'alcool et certains facteurs hormonaux. Le VHB est par ailleurs, la deuxième cause mondiale de cancer après le tabac (Barraud et al 2000).

Le résumé de l'histoire naturelle de l'infection par le VHB est représenté dans la figure suivante :

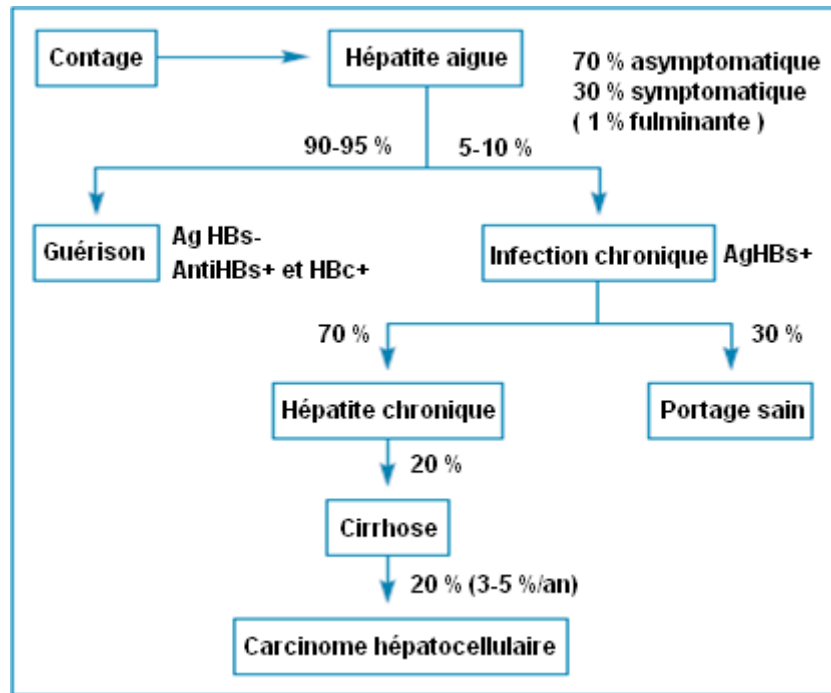


Figure 16 : Histoire naturelle de l'infection virale B (Pol 2006)

G. Diagnostic virologique de l'hépatite virale B

Les outils virologiques utiles pour le diagnostic, le suivi et la prise en charge thérapeutique des hépatites virales liées au virus de l'hépatite B (VHB) sont à la fois sérologiques et moléculaires. À côté des tests classiques de détection des antigènes viraux et des anticorps dirigés contre eux, de nouvelles techniques de biologie moléculaire permettent aujourd'hui une quantification plus sensible et plus précise de l'ADN virale. De nouveaux marqueurs, comme le génotype du VHB ou le profil des substitutions amino-acidiques associées à la résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques, pourraient également trouver une indication en pratique clinique (Ajana 2006, Pawlotsky 2008).

1. Marqueurs sériques utilisés en routine

Sept marqueurs virologiques ont une utilité en pratique clinique, dont six marqueurs sérologiques et un marqueur moléculaire (l'ADN VHB).

a. tests de détection des antigènes du VHB et des anticorps anti-VHB

Les méthodes de détection utilisées sont toutes basées sur des tests immunoenzymatiques de type ELISA. Ces tests sont appelés "sandwich" car l'antigène ou l'anticorps recherchés sont pris en "sandwich" entre deux anticorps lorsqu'il s'agit d'un antigène et deux antigènes lorsqu'il s'agit d'un anticorps. Les méthodes immuno-enzymatiques sont faciles à utiliser, automatisables et, de ce fait, permettent de traiter un grand nombre d'échantillons. Elles sont en outre peu coûteuses.

Six marqueurs sérologiques peuvent être cherchés par les méthodes immuno-enzymatiques: L'antigène de surface du VHB (AgHBs), les anticorps anti-HBs, l'antigène "e" du VHB (Ag HBe), les anticorps anti-HBe, les anticorps dirigés contre la protéine de capsid de VHB (anticorps anti-HBc).

Depuis 1968, le diagnostic de portage du HBV (infection aiguë ou chronique) repose toujours sur la recherche de l'antigène HBs dans le sérum des patients, il est le témoin d'une infection récente ou ancienne par le VHB selon la présence ou l'absence d'autres marqueurs sérologiques (Ag HBe, anticorps anti-HBs, Ig totales et IgM anti-HBc et anticorps anti-HBe) mais ne nous renseigne pas sur l'état de la réplication virale (Ayari et al 2006).

La sensibilité et la spécificité des tests de détection de l'AgHBs ont été récemment améliorées. Les résultats faussement positifs sont très rares, mais une première détection de L'Ag HBs doit toujours être confirmée par un test de neutralisation.

La détection de l'antigène HBe sérique est un marqueur d'une réplication virale active du VHB. Cependant, des facteurs peuvent intervenir et moduler le profil d'expression du système HBe, rendant l'interprétation du diagnostic sérologique plus

délicate. En effet, la présence d'anticorps anti-HBe ne permet plus d'affirmer la disparition complète de la réplication virale puisque les virus « mutants pré C » peuvent émerger spontanément au cours de la chronicité de l'infection virale. La confirmation de la présence d'une souche virale mutante peut être révélée par des tests de biologie moléculaire (Ajana 2006).

b. Recherche d'ADN viral

La détection et la quantification du génome du VHB peuvent être réalisées dans le sérum, le tissu hépatique ou dans les cellules mononuclées sanguines. Elles reposent classiquement sur deux types de techniques (Pawlotsky 2008): les méthodes d'amplification de la cible, de type Polymérase Chain Reaction (PCR), et les méthodes d'amplification de signal, comme la capture d'hybrides ou la technique des ADN branchés. Ces techniques sont progressivement remplacées dans les laboratoires de virologie par les techniques de PCR dites «en temps réel». Celles-ci sont plus sensibles que les techniques classiques et bénéficient d'un intervalle de quantification linéaire plus étendu. Celui-ci permet une quantification précise des charges virales élevées comme des charges virales basse observées sous traitement, faisant de ces techniques l'instrument de choix du suivi de la réponse virologique à la thérapeutique. Enfin, les techniques de PCR en temps réel n'exposent pas au risque de faux positifs liés à des contaminations et sont partiellement ou entièrement automatisées. Les résultats sont exprimés en UI/ml, indispensable pour la standardisation des résultats et l'émission de recommandation pratiques largement applicables.

On peut amplifier différentes régions du génome avec des amorces appropriées (préS, S, C). Chez les sujets porteurs chroniques d'antigènes HBs cette recherche sert à déterminer le degré d'infectiosité, l'intensité de la réplication et l'opportunité

d'un traitement antiviral. En effet l'ADN viral est un meilleur marqueur de réplication virale que l'antigène HBe.

2. Les nouveaux marqueurs virologiques

Un certain nombre de nouveaux marqueurs virologiques ont été utilisés dans des essais thérapeutiques chez des malades infectés par le VHB. Principalement moléculaires, ils ne sont pas toujours disponibles dans les laboratoires de virologie, leur intérêt et leur utilisation optimale en pratique clinique restent à établir.

a. Les méthodes de génotypage

Les progrès des techniques d'analyse des génomes viraux favorisent désormais l'exploitation de la variabilité génétique du VHB, et la différenciation de ses différents génotypes. Ces techniques sont comparées à la technique de séquençage et à l'analyse phylogénétique qui constitue la méthode de référence. Ce sont: l'analyse par polymorphisme de restriction, l'utilisation d'amorces spécifiques de type lors d'une réaction par amplification génomique de PCR ou les techniques d'hybridations différentielles le «reverse dot blot», technique relativement simple en cours de commercialisation par la firme Innogenetics (Gand, Belgique). Des techniques sérologiques permettent également de sérotyper le VHB avec une bonne concordance avec le génotypage (Halfon et al 2002).

a.1. Séquençage et analyse phylogénétique

Le séquençage, méthode de référence, consiste à amplifier par PCR puis séquencer la région d'intérêt du virus du patient, en l'occurrence la RT. L'interprétation des résultats demande une contribution humaine importante, y compris un contrôle visuel de la qualité de la séquence obtenue de chacun des brins d'ADN, une décision concernant les résultats ambigus ou ceux qui diffèrent de la séquence de référence, l'assemblage des séquences partielles de chaque amorce

pour former une séquence complète, la traduction en acides aminés, l'établissement d'un rapport et l'enregistrement dans une base de données. Cette méthode présente l'avantage de détecter toutes les mutations d'intérêt et comme inconvénient de ne détecter que les espèces majoritaires. La sensibilité de caractérisation des mutants est dépendante de celle de la PCR qui a permis d'amplifier initialement les fragments (Halfon et al 2003).

Actuellement, le séquençage du génome entier du VHB et l'analyse phylogénétique constituent la méthode de référence pour le génotypage des souches de VHB (Wagner et al 2004). Toutefois, la comparaison des séquences obtenues sur le génome entier et dans la région du gène S a montré que les séquences dans la région S permettaient également d'identifier précisément les génotypes de A à F. Une région intéressante pour le génotypage est la région du gène P chevauchant le gène S (figure 9), dont l'amplification puis le séquençage permet l'identification du génotype dans le cadre de lecture du gène S et la détection simultanée des mutations de résistance au traitement dans le cadre de lecture du gène P. Une trousse standardisée ciblant cette région du génome est commercialisée par Bayer Diagnostics (Trugene HBV Kit). Si la région S est la plus fiable pour le génotypage, elle ne permet cependant pas de détecter les éventuelles recombinaisons entre les souches de VHB. Aucune souche de référence n'est à ce jour disponible pour la standardisation ou les contrôles de qualité des tests de génotypage.

a.2. Analyse par polymorphisme de restriction

L'analyse par polymorphisme de restriction (restriction fragment length polymorphism : RFLP) repose sur la différence de taille d'amplicons du gène S après digestion enzymatique (Wagner et al 2004). Après une étape d'amplification, les séquences sont digérées par plusieurs endonucléases (HphI, NciI, AlwI, EarI et

NlaIV) et les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse. La taille des différents fragments est caractéristique de chaque génotype. Toute mutation portant sur la région analysée peut entraîner la suppression ou, au contraire, la création d'un site de restriction et fausser les résultats du génotypage.

a.3. Utilisation d'amorces spécifiques de type

Cette méthode repose sur l'existence d'une divergence intergroupe de la séquence nucléotidique au niveau d'une région conservée des gènes préS1/S. L'ADN du VHB est amplifié par PCR nichée : alors que les amorces utilisées lors de la première PCR permettent l'amplification de tous les génotypes de A à F, les amorces de la seconde PCR sont spécifiques de chacun. L'identification des génotypes est fondée sur la différence de taille des amplicons (Wagner et al 2004).

a.4. Hybridation sur support solide

Des techniques d'hybridation à l'aide de sondes spécifiques sur bandelettes de nitrocellulose (line probe assay : LiPA) ou, récemment, en microplaque (genotype specific probe assay : GSPA) sont des méthodes rapides, standardisées: le test INNO-LIPA HBV Genotyping (Innogenetics) différencie les génotypes A à F, et la trousse Smitest HBV genotype detection (Genome Science Laboratories) identifie les génotypes A à G. Dans un premier temps, l'ADN du VHB est amplifié par PCR dans la région préS1. Ensuite, les produits de PCR sont mis en contact avec des sondes marquées, spécifiques de chaque génotype, fixées sur des bandelettes de nitrocellulose (LiPA) ou au fond des puits d'une microplaque (GSPA). Le résultat de l'hybridation est révélé par réaction colorimétrique (Wagner et al 2004, Zoulim 2006).

a.5. Tests sérologiques

Des techniques sérologiques permettent également de déterminer les sérotypes du VHB avec une bonne concordance avec le génotypage. Un panel d'anticorps

monoclonaux dirigés contre sept épitopes de la région préS2 permet de différencier les génotypes selon leurs réactivités antigéniques. Les protéines préS2 fixées au fond des puits d'une microplaque sont testées avec les anticorps monoclonaux marqués, reconnaissant les épitopes *b* (commun à tous les génotypes), *k*, *m*, *s*, *u* et *g*. Chaque génotype est caractérisé par une combinaison différente des épitopes : *bsu* pour le génotype A, *bm* pour le B, *bk* pour le F. Les génotypes D et E possèdent la même spécificité antigénique *bks*, mais seul le génotype D réagit avec l'anticorps dirigé contre l'épitope *g*. Le génotype G est caractérisé par un sérotype préS2 identique à celui du génotype D et un AgHBs de sous-type *adw* (Wagner et al 2004). La difficulté de ces différentes méthodes de génotypage réside dans l'interprétation des mutations associées à la résistance vis-à-vis d'un médicament, Leurs avantages et inconvénients sont rapportés dans le tableau 7.

Méthodes de génotypage	Avantages	Inconvénients
Séquençage et analyse phylogénétique	Fiabilité et Détection des nouveaux génotypes et des recombinants	- Durée - Maîtrise des logiciels d'analyse phylogénétique - Défaut de détection des mélanges de génotypes
RFLP	Facilité d'utilisation	Mutation affectant le résultat
Amorces spécifiques de type	Rapidité et facilité d'utilisation	Mutation affectant le résultat
INNO-LiPA Genotyping Kit	Test standardisé Sensibilité de détection des co-infections	Coût Mutation affectant le résultat
Sérotypage / génotypage	- coût réduit - utilisation pour des études à grande échelle - Pas d'amplification par PCR	Mutation affectant le résultat

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes de génotypage du VHB et de leurs avantages et inconvénients (Wagner et al 2004)

b. Profil des substitutions amino-acidiques associées à la résistance au traitement de l'hépatite B

Des tests sensibles peuvent aujourd'hui identifier les variants viraux portant des substitutions amino-acidiques associées à la résistance aux analogues nucléos(t)idiques.

L'analyse de la séquence amino-acidique de la transcriptase inverse du VHB, cible des analogues nucléos(t)idiques, reste la méthode de référence. Le test INNO-LiPA HBV DR (Innogenetics), fondé sur l'hybridation inverse, permet également de mettre en évidence les substitutions amino-acidiques connues pour être associées à la résistance, à la lamivudine et à l'adéfovir, ainsi que celles associées à la résistance à l'entécavir (Pawlotsky 2008).

De nouvelles techniques sont en développement, comme la spectrométrie de masse ou les technologies utilisant des puces à ADN, qui présenteront l'avantage de détecter simultanément un grand nombre de substitutions et d'identifier des variants viraux très minoritaires au sein des populations virales circulantes.

c. Quantification de l'ADNccc intra-hépatique et de l'Ag HBS sérique

La persistance de l'infection virale B est liée à la présence, au sein du noyau des hépatocytes, d'ADN viral superenroulé (covalently closed circular DNA, cccDNA). La décroissance de la quantité de l'ADNccc dans le foie semble être un marqueur prédictif de séroconversion HBe et HBs. Il est possible de quantifier l'ADNccc intra-hépatique à l'aide de méthodes de PCR quantitative. Ces techniques sont cependant lourdes, non standardisées, et nécessitent la réalisation de biopsies hépatiques itératives (Pawlotsky 2008).

H. Traitement de l'hépatite virale B

Le traitement s'adresse aux patients porteurs d'une hépatite B associée à une réplication virale (AND-VHB positif), une cytolysse (transaminases élevées) et à la présence sur la biopsie d'une activité nécrotico-inflammatoire et/ou d'une fibrose significative. Il n'y a pas de bénéfice à traiter un patient en état d'immunotolérance (ADN-VHB positif, transaminases normales, histologie hépatique sans activité nécrotico-inflammatoire) ou porteur inactif du VHB (ADN-VHB indétectable ou faible $<10^4$ copies/ml, transaminases normales, histologie hépatique sans activité nécrotico-inflammatoire) (Vochelle et al 2007).

L'objectif du traitement de l'infection chronique virale B est de réduire le risque d'évolution vers la cirrhose, et l'incidence du carcinome hépatocellulaire. Cet objectif ne peut être atteint qu'en faisant régresser les lésions inflammatoires hépatiques par un contrôle de la réplication virale B (Ajana 2006, Kahloun et al 2010).

Les approches thérapeutiques de l'hépatite B ont connu plusieurs évolutions successives depuis le repos au lit des années 1950 et le traitement aux corticoïdes des années 1960, jusqu'à l'apparition des premières molécules réellement efficaces à la fin des années 1970 : d'abord, l'interféron en 1976, initialement leucocytaire puis recombinant au début des années 1990, puis l'interféron pégylé en 2004 (Trépo et al 2009).

Le traitement de l'hépatite B chronique peut actuellement reposer sur plusieurs options incluant l'interféron sous forme pégylé, et des analogues de nucléosides, inhibiteurs de la polymérase virale, d'administration orale et bien tolérés, comme l'adéfovir, l'entécavir, la telbivudine, le ténofovir et la combinaison de ténofovir et d'emtricitabine (non approuvée pour le traitement de l'hépatite B chronique mais approuvée en cas de co-infection VIH—VHB). Ces agents antiviraux induisent une

virosuppression efficace qui s'accompagne d'une amélioration des transaminases et de l'histologie hépatique (Zoulim 2008).

Chaque traitement présente des avantages et des inconvénients :

- Le traitement par interféron pégylé est la seule option permettant une durée de traitement définie qui est habituellement d'un an, et entraînant le plus souvent une séroconversion HBs. Cependant, environ 70 % des patients traités ne présentent pas de réponse prolongée.
- L'utilisation des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques constitue une véritable avancée dans le traitement de l'hépatite chronique B. Ces molécules ont une efficacité antivirale supérieure à celle de l'IFN, ont un meilleur profil de tolérance et sont administrées par voie orale. Ils permettent une viro-suppression optimale, définie par une indétectabilité de l'ADN viral B après 48 à 96 semaines de traitement, chez la plupart des patients quel que soit le type de virus (sauvage ou mutant pré-C), d'hépatopathie sousjacent (cirrhose ou non) ou de statut immunitaire (mono- ou co-infection VIH/VHB) (Pol et al 2010). Cependant, les taux de séroconversion HBe et HBs restent faibles nécessitant une administration à long terme (Zarski 2010). En effet, lors de l'arrêt de la thérapie, on observe chez la majorité des patients une reprise de la réplication du virus. Le problème majeur lié à l'utilisation prolongée de ces traitements est l'émergence de virus mutants résistants nécessitant donc un suivi clinique et virologique rapproché pour dépister les résistances de façon précoce et adapter le traitement antiviral, avant la détérioration de la maladie hépatique. L'apparition de ces virus résistants constitue un facteur limitant pour l'utilisation de ces molécules antivirales. Par rapport à la lamivudine, l'incidence de la résistance est plus faible pour l'adéfovir et très faible pour

l'entécavir, mais l'apparition de mutations reste à prévoir et la question des combinaisons thérapeutiques reste ouverte (Asselah et al 2008, Fournier et al 2008, Zarski et al 2008, Marcellin et al 2008).

Les marqueurs sanguins de réponse thérapeutique sont la baisse de la charge virale, la normalisation des transaminases, ainsi que les séroconversions Ag HBe/Ac anti-HBe et Ag HBs/Ac anti-HBs, cette dernière traduisant la guérison virologique (Vochelle et al 2007).

La réponse thérapeutique paraît différente en fonction des génotypes du VHB. Une étude a récemment montré une moins bonne réponse au traitement par interféron alpha des malades infectés par le génotype C comparé à ceux infectés par le génotype B (Halfon et al 2002).

Avant tout traitement, le patient atteint d'hépatite chronique B doit avoir un génotypage viral et une charge virale ; une bonne réponse à l'interféron pégylé étant associée à une charge virale inférieure à 10⁷ copies/ml et un génotype A ou B (et des transaminases à trois fois la normale). En cas de traitement par les analogues nucléosidiques, la réponse thérapeutique est identique quel que soit le génotype viral. Dans le cas de l'entécavir récemment ajouté dans l'arsenal thérapeutique contre ce virus, les informations sont encore insuffisantes pour déterminer l'existence ou non d'une relation traitement-génotype (Lamoril et al 2007).

Malgré l'évolution récente des thérapeutiques antivirales, le traitement de l'hépatite B chronique est difficile et coûteux, et la prévention de l'infection par le VHB par une politique vaccinale systématique reste actuellement la meilleure option pour réduire la morbidité et la mortalité par insuffisance hépatique et cancer du foie (Muszlak et al 2007).

I. Vaccination contre l'hépatite virale B

Le vaccin a été produit à partir d'antigène HBs purifié (vaccin dérivé du plasma) puis par biologie moléculaire permettant la synthèse d'anticorps dirigés contre les protéines du gène de surface du virus de l'hépatite B. ces deux types de vaccin (plasmatisques et recombinants) ont une immunogénicité comparable induisant l'apparition d'anticorps anti-HBs à un titre protecteur (>10 mU/mL) dans 90 à 95 % des cas (Degos 2006, Pol 2009).

Le vaccin du VHB porte le déterminant HBs (Engérix) ou HBs (+) pré S2 (Génhévac B). La forme adulte est de 20 µg, enfant 10 µg, nouveau-né 5 µg. Le protocole standard recommandé chez l'adulte est de trois injections à des intervalles d'un mois, avec une dose de rappel un an plus tard. Le calendrier pour les nourrissons et les adolescents comprend trois injections administrées à 0, 1 et 6-12 mois (Michel et al 2010). L'efficacité vaccinale se définit par l'aptitude du vaccin à réduire significativement l'incidence de l'hépatite B chez les sujets vaccinés comparativement à des sujets n'ayant pas reçu le vaccin (Hanslik et al 2006).

Le vaccin contre l'hépatite B est le premier et actuellement le seul vaccin contre un cancer humain qui est celui du foie (Pineau et al 2010).

Les personnes concernées par la vaccination sont le personnel de santé, les sujets devant être transfusés (en particulier les polytransfusés), les toxicomanes, toute personne vivant sous le même toit avec un porteur chronique du VHB et Les enfants nés de mères positives pour l'Ag HBs.

La protection conférée par la vaccination contre l'hépatite B peut être objectivée directement par la détermination des titres d'anticorps anti-HBs. La présence d'un titre d'anticorps supérieur à 10 UI/l a été démontrée comme protectrice, établissant ainsi un seuil minimal de protection des anticorps. La durée de persistance de ces

anticorps est directement liée au taux atteint un à trois mois après la troisième dose vaccinale, dose indispensable à l'installation de la mémoire immunitaire. Les lymphocytes T mémoire et les lymphocytes B mémoires ne sont réactivés que lorsqu'ils sont à nouveau mis au contact de l'antigène dont ils sont spécifiques. En réponse à une exposition infectieuse (ou vaccinale en cas de rappel), les cellules mémoires prolifèrent très rapidement et se différencient en 3 à 5 jours en plasmocytes producteurs de taux élevés d'anticorps ou en lymphocytes T CD4/CD8 capables d'éliminer particules virales et/ou cellules infectées.

Grâce à l'induction de cellules mémoires, les sujets répondeurs sont vraisemblablement protégés toute leur vie, même après la disparition des anticorps anti-HBs protecteurs ou le passage de leur taux en dessous du seuil de 10 UI/l (Gaudelus 2010).

En plus de la vaccination préventive contre l'hépatite virale B on distingue (Ajana 2006) :

➤ **La vaccination post-accident**

Elle est recommandée dans les 72 heures qui suivent l'exposition au risque infectieux au VHB (rupture de préservatifs, par exemple ou exposition au sang contaminé par le VHB).

➤ **La vaccination post-exposition du nouveau-né**

Elle est depuis longtemps efficace à plus de 75 %. La transmission materno-fœtale de l'HVB est de loin la plus élevée (30 à 90 %) de toutes les infections acquises au cours de la grossesse, avec une fréquence aussi élevée de la chronicité chez l'enfant.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Il s'agit d'une étude prospective, qui a été menée au laboratoire de biologie moléculaire à l'institut Pasteur du Maroc (Casablanca), entre Mars 2006 et Juillet 2009. Elle a intéressé 16 634 personnes qui se sont fait dépistées pour la première fois pour une infection éventuelle par le VHB.

A. Etude épidémiologique

1. Population étudiée

Les individus ayant participé à cette étude étaient recrutés suite au lancement d'une campagne de dépistage gratuit de l'hépatite B dans les 15 villes marocaines suivantes : Rabat, Salé, Kenitra, Casablanca, Eljadida, Mohammedia, Khouribga, Benslimane, Berrechid, kalaat sraghna, Safi, Settat, Béni Mellal, Marrakech et Agadir.

Au niveau de chaque ville, cette campagne de dépistage du VHB, a été menée par l'Institut Pasteur de Casablanca en collaboration avec les établissements de santé, et les médecins de travail de différentes entreprises (Sociétés, banques, administrations...). La participation à cette étude était donc entièrement volontaire.

Des prélèvements sanguins ont été effectués chez ces participants, pour être dépistés pour le VHB. Sont exclues de l'étude les personnes déjà connues porteuses de ce virus.

2. Prélèvements

Les prélèvements de sang ont été recueillis stérilement dans des tubes à EDTA. Le plasma sanguin obtenu, après centrifugation pendant 20 min à 600g, est le matériel biologique utilisé dans cette étude.

Les plasmas non destinés à être utilisés dans les 72h, ont été congelés à - 20°C sous formes de parties aliquotées stérilement, de 800 à 1000µL dans des tubes en polypropylène avec bouchon à vis (de type Sarstedt).

Les cycles de congélation et décongélation répétés ont été évités, et après décongélation, les échantillons étaient soigneusement homogénéisés avant leur analyse.

3. Dépistage du VHB

L'antigène de surface (AgHBs) est le marqueur sérologique le plus couramment utilisé pour le diagnostic et le dépistage du VHB.

Dans la présente étude, le test utilisé pour la recherche de l'AgHBs, est le test immunoenzymatique de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) de 3^{ème} génération. La technique ELISA est réalisée à l'aide du Kit « Murex HBs Ag version 3 » (ABBOTT Diagnostics), qui est d'une grande sensibilité et d'une grande spécificité.

3.1. Principe de la méthode

La technique ELISA utilisé se fait par le Kit « Murex HBs Ag version 3 » (ABBOTT Diagnostics). Dans ce test l'échantillon est préincubé dans des cupules recouvertes d'un mélange d'anticorps monoclonaux de souris spécifiques de différents épitopes du déterminant "a" de l'AgHBs. Des anticorps de chèvre purifiés dirigés contre l'AgHBs conjugués à la peroxydase de raifort sont alors ajoutés à l'échantillon contenu dans la cupule. Lors des deux étapes d'incubation, tout AgHBs présent dans l'échantillon, forme un complexe anticorps-antigène-anticorps-enzyme dans la cupule.

S'il n'y a pas d'AgHBs, le conjugué ne sera pas lié. Une solution contenant le substrat TMB (3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine) et de l'eau oxygénée est ajoutée dans les cupules.

Les cupules qui contiennent de l'AgHBs, et donc du conjugué lié, développeront une couleur violette qui vire à l'orange lorsque la réaction enzymatique est stoppée par de l'acide sulfurique.

L'intensité de la coloration est déterminée par spectrophotométrie et elle est directement proportionnelle à la quantité d'AgHBs présent dans l'échantillon.

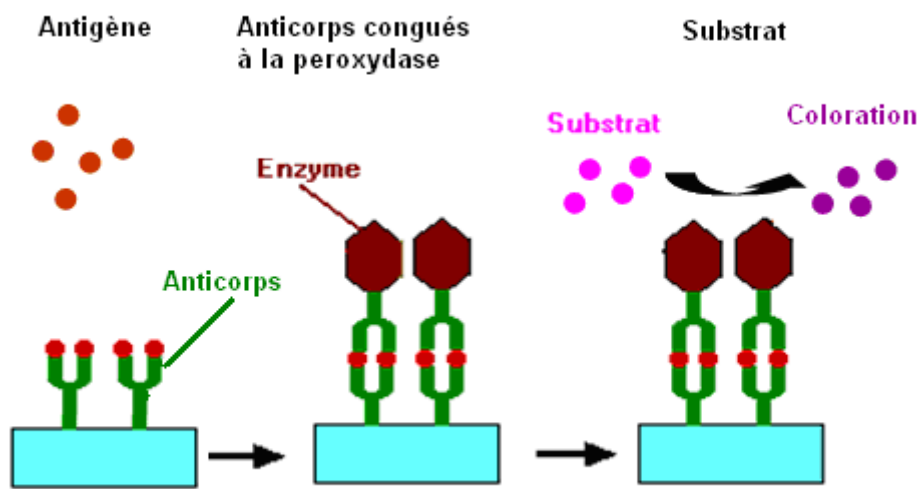


Figure 17: Principe du test Elisa

3.2. Procédure du dosage

Une plaque (9F80-01) de 96 cupules, recouvertes d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre l'Ag HBs, est utilisée pour ce dosage.

Vingt cinq microlitres (25µL) de diluant pour échantillon sont ajoutés dans chaque cupule. Ce diluant est un tampon vert/brun avec des détergents et des protéines de chèvre et de bœuf. Après addition de l'échantillon ou du contrôle, cette couleur vire au bleu/vert, ce changement de coloration peut varier d'un échantillon à l'autre mais doit toujours être visible.

En suite, 75µL d'échantillon à tester ou de contrôle sont ajoutés dans les cupules. Le contrôle négatif est un sérum humain normal, alors que le positif est un

sérum humain inactivé. Chacun des deux sérums est dilué dans du tampon contenant des protéines d'origine bovine.

Le contrôle négatif est déposé dans les puits A1 et B1, et le positif dans le puits C1. L'ajout des contrôles dans les puits indiqués sur chaque plaque se fait après avoir distribué les échantillons à tester. L'utilisation d'un fond blanc est utile pour visualiser l'addition des échantillons. Ces derniers doivent être soigneusement homogénéisés avec le diluant pour échantillon.

La plaque est ensuite recouverte d'un couvercle et incubée pendant 1 heure à 37°C dans des conditions d'humidité.

A la fin du temps d'incubation on ajoute immédiatement dans chaque puits 50µL de conjugué. Ce dernier est de couleur brune, il contient des AC (monoclonaux de chèvre) lyophilisés, marqués à la peroxydase de raifort dans une base protéique bovine.

Après incubation de la plaque, recouverte, pendant 30min à 37°C dans des conditions d'humidité, cette dernière est lavée, automatiquement, par un liquide de lavage qu'on prépare par la dilution de la Glycine/Borate au 1/20 à l'eau distillée. Ce système automatique est programmé sur 5 cycles de lavage, le rôle de ce dernier est d'éliminer tous les éléments non fixés.

Après lavage de la plaque, 100µL de solution substrat sont immédiatement ajoutés dans chaque cupule. Cette solution est préparée par l'ajout d'un volume de diluant du substrat incolore à un volume égal de concentré de substrat rose contenant de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine « TMB » et des stabilisants. La solution substrat devient pourpre au contact des puits positifs.

La dernière incubation de la plaque se fait pendant 30 min à l'abri de la lumière. Une couleur pourpre proportionnelle à la quantité d'AC devrait apparaître dans les puits contenant des échantillons positifs.

Cinquante microlitre (50µL) de solution d'arrêt (acide sulfurique) sont ajoutés dans chaque cupule. Enfin, la lecture de la densité optique est effectuée dans les 15 min à la longueur d'onde 450nm.

3.3. Résultats et interprétation

Les échantillons fournissant une densité optique inférieurs à la valeur seuil ($CN1 + CN2 / 2 + 0,05$) sont considérés comme initialement non réactifs dans le dosage.

Les échantillons fournissant une densité optique élevée sont considérés comme initialement réactifs dans le dosage. Ces échantillons ont été réanalysés en double en utilisant le prélèvement d'origine. Les échantillons réactifs pour au moins une des réanalyses sont considérés comme réactifs de manière reproductible et présumés contenir l'Ag HBS et doivent être confirmée par le test de confirmation. Les échantillons non réactifs dans les deux puits lors de la réanalyse sont considérés comme non réactif.

4. Test de confirmation

Tous les sérums trouvés positifs au premier test, subissent un test de confirmation par le Kit Murex HBsAg confirmatory Version 3, dont le fonctionnement est basé sur l'utilisation d'un AC spécifique de neutralisation des échantillons trouvés réactifs par le test Murex HBsAg. Contrairement au test Ag HBs qui utilise des AC de chèvre et de souris, le réactif de confirmation utilise un AC spécifique dérivé du cheval (qui est génétiquement plus proche de l'homme que la chèvre ou la souris),

ce qui minimise le risque de confirmation d'échantillon faussement positifs contenant des AC anti-espèce.

4.1. Principe de la méthode :

Deux cupules sont attribuées à chaque échantillon à analyser, le test Murex AgHBs est effectué selon la procédure habituelle (ELISA AgHBs), à la différence près que le diluant échantillons est remplacé par le réactif contrôle (sérum de cheval, de chèvre, du sérum bovin et humain (non réactif à l'AgHBs) dans la cupule contrôle et par le réactif spécifique (anticorps spécifique de cheval dirigés contre l' AgHBs) dans la cupule spécifique.

Au cours de la première incubation, l'Ac anti-HBs de cheval du réactif spécifique entre en compétition avec l'Ac de souris immobilisés sur la cupule pour se fixer sur l'AgHbs présent dans l'échantillon et réduire ainsi la quantité d'Ag HBs lié à la cupule, dans la cupule contrôle, aucune compétition n'a lieu et l'Ag HBs se lie normalement, le conjugué est ensuite ajouté et le test est effectué de manière normale. Dans les échantillons contenant l'Ag HBs, il y aura une différence significative entre la DO obtenue dans la cupule de contrôle et celle obtenue dans la cupule spécifique, si l'inhibition dans la cupule spécifique dépasse 50% l'échantillon est considéré comme confirmé réactif.

4.2. Procédure du test :

Vingt cinq microlitres (25µL) de réactif contrôle ou de réactif spécifique sont ajoutés dans les cupules appropriées.

Le réactif contrôle est un tampon de couleur jaune contenant du sérum de cheval, de chèvre, du sérum bovin et humain non réactifs pour l'Ag HBs ainsi que des détergents conservateur : ProClin R 300 (0.05 %).

Le réactif spécifique est un tampon de couleur rouge contenant des anticorps spécifiques de cheval dirigés contre l'Ag HBs, ainsi que des détergents conservateur : ProClin R 300 (0.05 %).

Soixante quinze microlitres (75µL) de contrôle Mureex Hbs Ag et d'échantillon à analyser sont ajoutés dans les cupules.

La plaque est ensuite remuée à l'aide d'un agitateur pour plaques pendant 10 secondes. Elle peut également être agitée manuellement en tapotant doucement sur le coté pendant 10 secondes.

A partir de cette étape le test est effectué d'une manière normale (même procédure que ELISA).

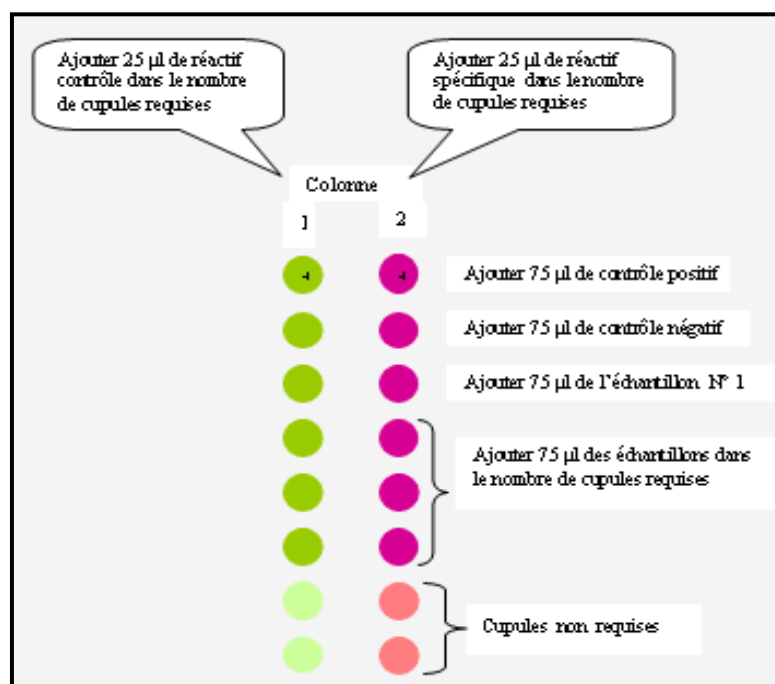


Figure 18: Configuration du test de confirmation pour la détection des AgHBs

4.4. Lecture des résultats :

Pour la lecture des résultats, on calcul d'abord la densité optique moyenne du contrôle négatif incubé, avec le réactif spécifique et le réactif contrôle.

Exemple : DO du contrôle négatif avec le réactif spécifique (NS) = 0.08

DO du contrôle négatif avec le réactif contrôle (NC) = 0.086

La moyenne du contrôle négatif = 0.083

La valeur seuil est ensuite calculée comme étant égale à la densité optique moyenne des contrôles négatifs + 0.05.

Le pourcentage d'inhibition du contrôle positif avec le réactif spécifique est calculé comme suit :

Exemple : DO du contrôle positif avec le réactif contrôle (PC) = 1.061

DO du contrôle positif avec le réactif spécifique (PS) = 0.121

Inhibition par le réactif spécifique : $(PC - NC) - (PS - NS) \times 100 / (PC - NC) = 95.8\%$

L'inhibition des échantillons réactifs se calcule selon l'exemple suivant :

DO de l'échantillon avec le réactif contrôle (EC) = 0.648.

DO de l'échantillon avec le réactif spécifique (ES) = 0.099.

L'inhibition par le réactif spécifique = $(EC - NC) - (ES - NS) \times 100 / (EC - NC) = 96.6\%$

4.5. Interprétation des résultats

Pour qu'un échantillon puisse être considéré comme confirmé réactif par le test MurexHbsAg, les critères suivants doivent être remplis :

- la densité optique avec le réactif contrôle doit être supérieure ou égale à la valeur seuil.

- l'inhibition par le réactif spécifique doit être supérieure ou égale à 50%.

Pour l'échantillon fortement réactif, les pourcentages peuvent parfois dépasser les 100%.

Si la densité optique dans la cupule contrôle est inférieure à 2, les échantillons fournissant une inhibition inférieure à 50% par le réactif spécifique sont considérés comme négatifs et donc faussement réactif par le test Murex HbsAg.

Un pourcentage d'inhibition négatif peut être obtenu et doit également être considéré comme un résultat négatif (le contrôle et le spécifique seront tous négatifs).

5. Recherche de l' ADN viral

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

Dans cette étude, 200 échantillons confirmés AgHBs positifs par le test immunologique, sont testés par PCR en temps réel, en utilisant la plate forme automatisée de Roche Diagnostics : Cobas AmpliPrep et Cobas TaqMan 48, pilotés tous les deux par le logiciel AmpliLink.

5.1. Extraction automatisée par le COBAS AmpliPrep :

L'extraction de l'ADN viral est effectuée à partir des sérums infectés par le VHB et confirmés positifs en sérologie. Ces sérums sont AgHBs(+) et peuvent être AgHBe(-) ou (+). Le but de l'extraction est d'obtenir des acides nucléiques plus ou moins purs et plus ou moins concentrés.

Le système d'extraction des acides nucléiques par le Cobas Ampliprep, utilise la technologie en billes magnétiques entourées de silicate.

Les particules virales du VHB sont lysées par un tampon de lyse permettant la libération des acides nucléiques qui se fixent sur les billes magnétiques entourées de silicate. Le système est composé d'un aimant qui permet l'accrochage des acides

nucléiques pendant les étapes de lavages. Les acides nucléiques sont libérés par la suite en utilisant un tampon d'élution.

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

L'analyseur COBAS TaqMan 48 est un système entièrement automatisé pour l'amplification et la détection d'acides nucléiques en utilisant la technologie de la 5' exonucléase utilisant les sondes TaqMan. Les tests aujourd'hui développés garantissent des performances inégalées, notamment en termes de linéarité et de sensibilité où l'on atteint des seuils exceptionnels pour tous les paramètres.

5.2.1. Principe de la méthode :

La sonde TaqMan présente deux fluorophores: un à l'extrémité 5' de la sonde (fluorophore donneur) et l'autre à l'extrémité 3' de la sonde (fluorophore "extincteur" ou quencher). "L'extincteur" étant à proximité du donneur, inhibe l'émission de fluorescence par ce dernier. Au cours de l'amplification, l'activité 5' exonucléase de la Taq DNA polymérase dégrade la sonde (dans la direction 5'→3'). Le fluorophore donneur sera dégagé de l'action de l'extincteur et émettra un signal fluorescent mesurable par l'instrument. Le suivi en temps réel de la fluorescence accumulée permet la quantification du produit PCR.

5.2.2. Sélection de la cible :

La sélection de la séquence d'ADN cible pour le VHB dépend de l'identification des régions qui, à l'intérieur du génome et sur l'ensemble des génotypes du VHB, ont le plus fort taux de conservation de la séquence. De la même manière, la sélection appropriée des amorces et de la sonde est essentielle pour permettre au test de détecter tous les génotypes. On a montré qu'une région de l'ADN génomique circulaire partiellement monocaténaire du VHB présente une conservation maximale

de la séquence d'ADN entre les génotypes du VHB connus. Le test COBAS TaqMan HBV utilise des amorces d'amplification PCR qui définissent une séquence à l'intérieur de la région hautement conservée du pré-noyau/noyau du génome du VHB.

5.2.3. Amplification de la cible :

Les échantillons traités ainsi que des standards de quantification (SQ) sont ajoutés au mélange d'amplification dans des tubes d'amplification (tubes K), dans lesquels se produit l'amplification PCR. Le SQ permet de quantifier la charge virale mais sert également de témoin de la PCR. Le thermocycleur de l'analyseur chauffe le mélange afin de dénaturer l'ADN bicaténaire et d'exposer les séquences cibles de l'amorce spécifique sur l'ADN génomique circulaire du VHB et sur l'ADN du SQ VHB. Au fur et à mesure du refroidissement du mélange, les amorces s'hybrident à l'ADN cible. L'ADN polymérase thermostable *Thermus species* Z05 ADN, en présence de Mn^{2+} et d'un excès de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP), dont la désoxyadénosine triphosphate, désoxyguanosine triphosphate, désoxycytidine triphosphate et la désoxyuridine triphosphate (au lieu de la thymidine), étend les amorces hybridées le long de la matrice pour produire une molécule d'ADN bicaténaire appelé amplicon. L'analyseur TaqMan répète automatiquement cette opération au cours d'un nombre défini de cycles préprogrammé dans l'analyseur, chacun devant doubler la quantité d'amplicons ADN produits. L'amplification ne concerne que la région du génome VHB située entre les amorces ; le génome VHB entier n'est pas amplifié.

5.2.4. Amplification sélective :

Dans le test COBAS TaqMan HBV, L'amplification sélective d'un acide nucléique à partir d'un échantillon est obtenue au moyen de l'enzyme AmpErase (Uracile – N–

glycosylase) et de désoxyuridine triphosphate (dUTP). L'AmpErase reconnaît et catalyse la destruction de brins d'ADN contenant de la désoxyuridine, mais non celle des brins d'ADN contenant de la désoxythymidine. L'ADN naturel ne contient pas de désoxyuridine, mais les amplicons en contiennent toujours en raison de l'utilisation de désoxyuridine triphosphate comme dNTP dans le mélange réactionnel. Ainsi, seuls les amplicons renferment de la désoxyuridine. La désoxyuridine permet la destruction des amplicons contaminants par l'AmpErase avant l'amplification de l'ADN cible.

L'AmpErase détruit également tout produit non spécifique formé après l'activation initiale du mélange réactionnel par le manganèse, ce qui améliore la sensibilité et la spécificité. L'AmpErase contenue dans le mélange réactionnel, catalyse le clivage de désoxyuridine renfermant de l'ADN au niveau des résidus de désoxyuridine en ouvrant la chaîne de désoxyribose en position C1. Au cours du réchauffage de la première étape du cycle thermique, la chaîne d'ADN (amplicons) se brise à hauteur de la désoxyuridine, rendant ainsi l'ADN non amplifiable. L'AmpErase est inactive à une température supérieure à 55 °C (c'est-à-dire, pendant toutes les étapes du cycle thermique) et ne détruit donc pas l'amplicon cible formé pendant l'amplification.

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

Le test TaqMan utilise une technologie PCR en temps réel, l'utilisation de sondes fluorescentes à double marquage permet une détection en temps réel de l'accumulation des produits PCR en surveillant l'intensité de l'émission des colorants fluorescents rapporteurs libérés pendant le processus d'amplification. Les sondes consistent en oligonucléotides spécifiques du VHB et du SQ VHB marqués par un colorant rapporteur et par un colorant extincteur. Dans ce test, les sondes du VHB et

du SQ sont marquées par différents colorants rapporteurs de fluorescence. Lorsque les amorces à colorants à double fluorescence sont intactes, la fluorescence du rapporteur est supprimée en raison de la proximité du colorant extincteur en raison des effets Förster de transfert d'énergie. Pendant la phase PCR, la sonde hybride une séquence cible et se trouve clivée par l'activité de la nucléase 5'→3' de l'ADN-P Z05 thermostable. Une fois que les colorants rapporteur et extincteur sont libérés et séparés, l'extinction ne se produit plus et la fluorescence du colorant rapporteur augmente. L'amplification de l'ADN VHB et ADN du SQ est mesurée indépendamment à des longueurs d'ondes différentes. Ce processus est répété pendant le nombre de cycles préprogrammés dans l'analyseur, augmentant ainsi l'intensité de l'émission des colorants rapporteurs individuels, permettant une identification indépendante de l'ADN VHB et ADN du SQ. L'intensité des signaux est fonction de la quantité initiale du matériel au commencement de la PCR.

B. Génotypage VHB

Le génotypage a été réalisé sur des plasmas de patients infectés par le virus de l'hépatite B et positifs pour l'ADN. La technique utilisée est basée sur le principe de l'hybridation inverse à l'aide de sondes spécifiques sur bandelettes de nitrocellulose « LINE Probe Assay : LIPA » ; c'est une méthode rapide et standardisée. Le test INNO-LIPA HBV Genotyping (Innogenetics) différencie les génotypes de A à G. Pour ce faire. On a commencé par l'extraction de l'ADN du VHB à partir des sérums des échantillons à analyser, avant de procéder à l'amplification génique pour étudier les génotypes.

1. Extraction de l'ADN :

La technique d'extraction utilisée dans cette étape se fait par le Kit « High Pure Viral Nucleic Acid » de Roche Diagnostics.

1.1. Principe de la méthode :

L'extraction et la purification de l'ADN par le kit « High Pure Viral Nucleic Acid » se fait à travers de petites colonnes de silice adaptées à des tubes de 1,5 à 2 ml.

Les particules virales du VHB sont lysées par incubation à température élevée (72°C) pendant 10 min, en présence de la protéinase K et d'un tampon à base de guanidine.

Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont les particules de silice d'adsorber les acides nucléiques en présence de fortes concentrations en sels de guanidine, qui en milieu acide et alcoolique, attirent les molécules d'eau permettant une réaction d'adsorption des acides nucléiques sur les particules de silice disposées en colonne.

Le tampon de lyse (fourni avec le kit) a été choisi de telle sorte que les débris cellulaires, les protéines et les molécules indésirables (inhibiteurs de PCR) restent en solution alors que l'ADN se fixe sur la silice.

Pendant la centrifugation, les acides nucléiques se fixent spécifiquement sur le filtre de silice. Les substances non liées comme les sels, les protéines et d'autres imputées cellulaires sont éliminées pendant la centrifugation.

Les acides nucléiques adsorbés sont lavés et élués dans la solution d'élution (elution buffer) pour le stockage et l'analyse.

1.2. Procédure du test :

Dans des tubes Eppendorf stériles sont déposés : 200 µL de plasma, 50 µL de la solution protéinase K et 200 µL de la solution de travail (WS).

- La solution protéinase K est préparée suite à la dissolution de 100 mg de la protéinase K lyophilisée dans 5 mL d'elution buffer (eau stérile doublement distillée) et agitation immédiate au vortex. Elle est en suite aliquotée par volume de 50 µl et conservée à - 20°C

- La solution de travail (WS) est préparée suite au mélange de 50 μ L de poly A avec 2.5 mL de binding buffer (tampon à pH 4.4 qui contient 6 M de la guanidine-HCl et 10mM de Tris-HCl).

Les tubes sont immédiatement agités au vortex et déposés au bain marie pendant 10 minutes à 72 °C.

Cent microlitre (100 μ L) de binding buffer sont ajoutés dans chacun des tubes.

Les tubes à filtre sont déposés dans les tubes collecteurs et le contenu de chaque tube eppendorf est pipeté dans le réservoir supérieur. En suite une centrifugation d'une minute à 8000×g est effectuée.

Les tubes à filtre sont déposés doucement dans de nouveaux tubes collecteurs et 500 μ L de la solution d'inhibitor removal buffer y sont ajoutés. Cette solution est obtenue suite à l'ajout de 20 mL d'éthanol absolu à 33 ml d'inhibitor removal buffer (5 M de la guanidine-HCl et 20mM de Tris-HCl) et agitation du mélange pour obtenir un pH final de 6,6.

Après une centrifugation d'une minute à 8000×g, les tubes à filtre sont déposés dans de nouveaux tubes collecteurs. Ensuite, 450 μ L du tampon de lavage sont ajoutés. Ce dernier est obtenu par addition de 40 mL d'éthanol absolu à 10 ml de wash buffer (20 Mm NaCl et 2 mM Tris-HCl), le pH final est de 7.5 après agitation.

Une centrifugation d'une minute à 8000×g est réalisée.

L'étape précédente est refaite puis une centrifugation de 10 secondes à 13000×g est effectuée.

Les tubes à filtre sont déposés doucement dans de nouveaux tubes eppendorff stériles, 50 μ L de tampon d'élution (elution buffer) sont ajoutés et une centrifugation d'une minute à 8000×g est réalisée.

On obtient à la fin 50 μ L d'acides nucléiques purifiés.

2. Amplification de l'ADN

La deuxième étape est l'amplification de l'ADN, purifié du VHB, par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans la région pré S1.

2.1. Choix des amorces :

L'amplification a été réalisée en utilisant la paire d'amorce P₁P₂ précédemment décrite par Lindh et al en 1998. P1 est l'amorce sens (nt. 2823–2845: 5'_TCACCATATTCTTGGGAACAAGA-3') ; P2 est l'amorce anti-sens (nt. 80–61: 5'-TTCCTGAACTGGAGCCACCA-3'). Les amorces sont situées dans des régions génomiques conservées de manière à assurer une haute sensibilité pour l'amplification de tous les génotypes du VHB.

2.2. Principe de la méthode :

Vingt microlitres (20 µL) d'ADN sont ajoutés à 30 µL de PCR Mix contenant : 0.4 µL de dNTPs (25mM), 1 µL de l'amorce P1 , 1 µL de l'amorce P2 , 3 µL de MgCl₂, 5 µL de tampon, 1 µL de Taq polymérase (2UI/µL) et 19.3 µL d'eau distillée stérile.

Le mélange réactionnel d'un volume de 50µL est placé dans un thermocycleur préprogrammé à 40 cycles de PCR (dénaturation : 1min à 95 °C ; hybridation : 1 min à 55 °C et polymérisation : 2 min à 72 °C).

Le mélange est chauffé (95°C) afin de dénaturer l'ADN double brin et d'exposer les séquences cibles de l'amorce. Alors que le mélange refroidit (55°C), l'amorce sens et anti-sens s'hybrident spécifiquement au brin d'ADN. A une température de 72°C, la Taq polymérase étire l'amorce et un second brin d'ADN est synthétisé.

Ceci termine le premier cycle de PCR, aboutissant à une copie de l'ADN bicaténaire de la région cible de l'ADN du VHB. Le mélange réactionnel est chauffé une deuxième fois pour séparer l'ADN bicaténaire obtenu et exposer les séquences cibles des amorces. Au fur et à mesure que le mélange refroidit, les amorces se

fixent à l'ADN cible. En présence de manganèse (Mn^{2+}) et de dNTPs en excès, la polymérase permet l'extension des amorces hybridées le long des matrices cibles pour produire une molécule d'ADN bicaténaire appelée amplicon.

L'opération se répète un nombre défini de cycles, chaque cycle doublant la quantité d'amplicons d'ADN. Le nombre de cycles nécessaires est programmé dans le thermocycleur (40 cycles). L'amplification exponentielle a lieu dans la région du génome du VHB située entre les amorces.

2.3. Révélation des produits de PCR :

La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique.

Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

La méthode de révélation la plus utilisée est la révélation au tampon de bromure d'éthidium (BET). Le BET est un agent d'intercalation, entre les bases de l'ADN, couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.

2.3.1 Préparation d'un gel d'agarose à 2 % :

Deux grammes d'agarose sont dissous dans 100 ml de tampon Tris Borate EDTA (TBE) 0,5X (0,045 M Tris-borate, 0,001 M EDTA). Le mélange est chauffé au four à micro-onde jusqu'à dissolution complète, ensuite 6 μ l de BET (10 mg/ml) sont introduits dans l'agarose fondu.

2.3.2 Préparation de la cuve à électrophorèse :

Pour la préparation de la cuve à électrophorèse, les joints fournis avec la cuve sont placés pour fermer le support de gel, et le peigne est positionné à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.

Ensuite, le niveau est réglé pour que le support de gel soit horizontal ; le gel est coulé lentement sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne.

Après polymérisation, le peigne et les joints sont enlevés, le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

Un volume de 15 µl de chaque ADN amplifié, mélangée avec 2 µl de bleu de charge, est déposé dans les puits correspondants sur le gel d'agarose.

Le bleu de charge est conçu pour faciliter le dépôt et le suivi de la migration des échantillons d'ADN dans le gel d'agarose.

Le marqueur de poids moléculaire 100 pb (ADN Ladder) mélangé avec 2µl de bleu de charge est également déposé dans le puit correspondant. Il est utilisé pour calibrer les fragments d'ADN double brin de 100 à 1500 pb.

Le support est placé avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode (pôle noir).

La cuve est remplie de tampon TBE en versant délicatement et très lentement lorsque le gel commence à être recouvert pour éviter les fuites d'ADN vers le tampon.

Après fermeture de la cuve, les fils sont branchés et mis sous tension. Et enfin, l'alimentation est coupée après 1 H de migration à 92 V et le gel est récupéré dans son support.

2.3.3. Lecture des résultats

Les bandes d'ADN amplifiées sont visualisées sur le transilluminateur à lumière ultra violette (U.V.). La lecture du gel d'électrophorèse se réalise sur une plaque UV, soit en lecture directe, soit avec une prise d'images.

3. Test INNO LIPA genotyping

3.1 Principe du test INNO LIPA genotyping

Le test INNO-LIPA est basé sur le principe d'hybridation inverse (figure 18). L'ADN biotinylé amplifié est hybridé à une membrane de nitrocellulose sur laquelle ont été préalablement déposés en bandes parallèles des sondes oligonucléotidiques spécifiques de chaque génotype. Après hybridation, l'ADN non fixé est lavé de la bandelette. De la streptavidine, marquée à une phosphatase alcaline, est ensuite ajoutée, elle se fixe aux hybrides biotinylés précédemment formés. L'incubation avec un chromogène BCIP/NBT entraîne un précipité brun/violet et les résultats peuvent être visuellement interprétés (figure 19).

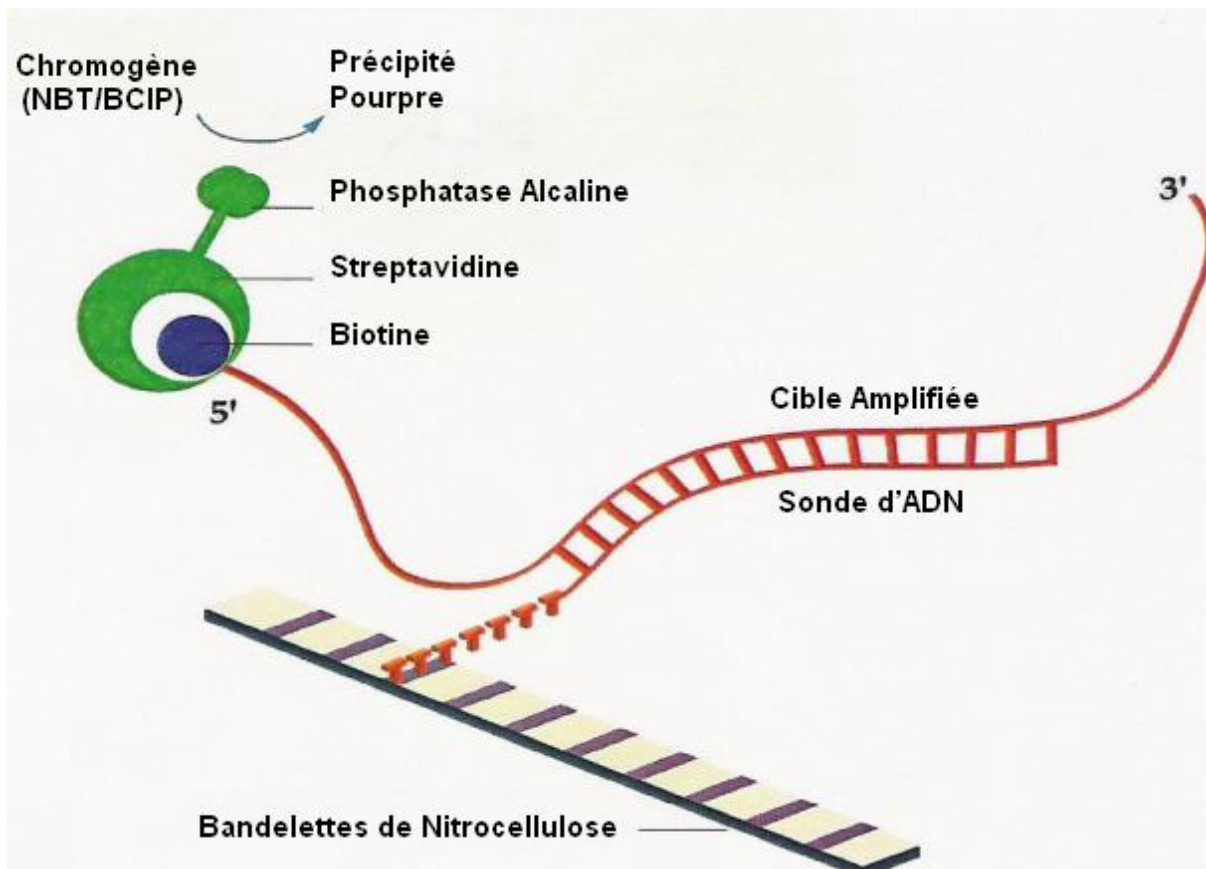


Figure 19: Principe du test INNO LIPA genotyping (MICROLAB 2005).

3.2. Procédure du test :

Tous les réactifs sont maintenus entre 2 et 8°C, y compris les bandelettes, et sont stables jusqu'à la date de péremption du Kit. Ce dernier doit être stocké isolé de toute contamination.

Tous les réactifs y compris le tube contenant les bandelettes sont ramenés à température ambiante (20 à 25°C), 30 minutes avant emploi et replacés au réfrigérateur immédiatement après utilisation.

Avant de commencer la technique, le bain marie à agitation est équilibré ; sa température doit être à $49^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

La solution d'hybridation et la solution de lavage sont placés dans un bain marie à 37 à 49 ° C pour dissoudre tous les cristaux. Les flacons sont secoués avant utilisation.

3.2.1. Dénaturation des échantillons

En utilisant une pince en plastique, le nombre requis de bandelettes INNO-LIPA est retiré, et un numéro d'identification est inscrit, au crayon, au dessus de la ligne du repère rouge sur la bandelette. Une bandelette pour le contrôle négatif (produit amplifié d'un échantillon VHB négatif) est toujours incluse.

Le nombre requis de compartiments (un par échantillon) est placé sur le support.

Un volume de 10 µl de solution de dénaturation (solution alcaline contenant de l'EDTA) est déposé dans le coin supérieur de chaque compartiment. Le flacon contenant cette solution est immédiatement refermé après usage, car une exposition prolongée à l'air conduit à une rapide détérioration du pouvoir dénaturant.

Dix microlitre (10 µl) du produit amplifié sont ajoutés dans la solution de dénaturation et mélangés soigneusement par pipetage.

Les bandelettes sont incubées 5 minutes à température ambiante (20 à 25°C).

3.2.2. Hybridation des échantillons :

Un volume de 2 ml de solution d'hybridation (tampon SSC avec des détergents et des conservateurs) est ajouté soigneusement dans chaque compartiment, en prenant soin de ne pas contaminer les compartiments voisins. la cuvette est agitée doucement pour mélanger les réactifs.

Une pince en plastique est utilisée pour placer, immédiatement, chaque bandelette dans le compartiment approprié, avec le côté marqué (ligne repère rouge) de la membrane orienté vers le haut, en s'assurant que les bandelettes sont complètement immergées dans la solution.

La plaque n'est pas couverte pour éviter toute contamination.

Le support est placé dans le bain marie à $49^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, en mettant en marche l'agitation à environ 80 tours par minute. Le couvercle est ensuite fermé et une incubation est réalisée pendant 60 minutes.

3.2.3 Le lavage des bandelettes

Le support est retiré du bain marie après l'étape d'hybridation, et le liquide de chaque compartiment est aspiré (en inclinant légèrement le support) à l'aide d'une pipette, de préférence branchée sur une pompe à vide.

Deux millilitres (2 ml) de solution de lavage (tampon phosphatase dilué au 1/5 en eau distillée) préchauffée sont ajoutés dans chaque compartiment. Le rinçage est réalisé par agitation de la plaque pendant 10 à 20 secondes à température ambiante, et la solution de lavage est ensuite aspirée de chaque compartiment.

Le lavage est répété une deuxième fois, un volume de 2 ml de solution de lavage est mis dans chaque compartiment et le support est placé dans le bain marie à $49^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en mettant en marche l'agitateur.

Une incubation de 30 min est ensuite réalisée, pendant laquelle la solution diluée de conjugué est préparée par dilution du conjugué (streptavidine marquée à la phosphatase alcaline en tampon Tris contenant des protéines stabilisatrices) au 1/100 avec le diluant conjugué (Tampon phosphatase contenant du NaCl, triton®, protéines stabilisatrices et 0,01% MIT /0,1% CAA comme conservateur).

3.2.4 Révélation:

Après l'étape de lavage et l'aspiration du liquide de chaque compartiment à l'aide d'une pipette, deux rinçages sont successivement réalisés par agitation du support pendant 1 minute à température ambiante, suite à l'ajout de 2ml de solution de rinçage.

Un volume de 2 ml de la solution de conjugué diluée est ajouté dans chaque compartiment, le plateau est placé sur un agitateur orbital à 160 rpm à température ambiante, et une incubation est réalisée pendant 30mn.

La solution de substrat diluée est préparée environ 10 mn avant la fin de l'incubation du conjugué. Cette solution est préparée par dilution du substrat BCIP / NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat et 4-nitro-bleu de tétrazolium) au 1/100 avec le tampon substrat (tampon tris contenant NaCl, Mg cl_2 0,01% MIT /0,1% CAA comme conservateur)

A la fin de l'incubation, la solution du conjugué est aspirée de chaque compartiment, et deux lavages successifs sont réalisés en ajoutant 2 ml de solution de rinçage dans chaque compartiment avec agitation du support pendant 1mn.

Après aspiration de la solution de rinçage, un dernier lavage est réalisé avec 2 ml de tampon substrat dans chaque compartiment et agitation du support pendant 1 mn à température ambiante.

Le tampon substrat est aspiré de chaque compartiment, et 2ml de solution substrat sont distribués avant une incubation sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante.

La révélation colorée est arrêtée par le lavage des bandelettes dans 2 ml d'eau distillée pendant au moins 3 mn sous agitation.

A l'aide d'une pince en plastique, les bandelettes sont retirées des compartiments et déposées sur un papier absorbant.

Les bandelettes développées sèches sont collées sur les feuilles de résultat, et conservées à l'obscurité et à température ambiante.

3.3. Interprétation des résultats :

L'interprétation des résultats se fait à l'aide du guide de lecture fourni (figure 19), qui montre la localisation des différentes sondes oligonucléotidiques sur les différentes bandelettes.

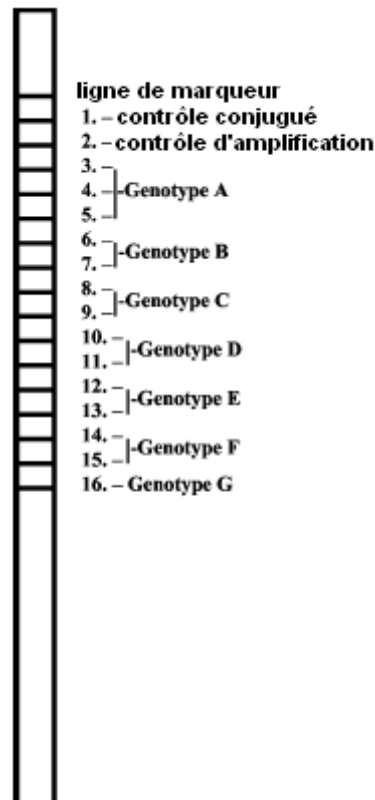


Figure 20: Représentation graphique de la bande du Test INNO-Lipa HBV Genotyping
(Osiowy 2003)

(Les bandes représentant les sondes oligonucléotidiques spécifiques pour les contrôles et chaque génotype du VHB sont présentées comme elles sont disposées sur la bandelette.)

Chaque bandelette du test INNO-Lipa HBV genotyping, contient 14 sondes spécifiques de génotype déposées en lignes parallèles, en plus d'une ligne de marqueur rouge située en haut de la bandelette permettant son orientation, et en fin deux bandes de contrôle:

➤ La bande de contrôle conjugué fournit un contrôle de développement de la coloration. Elle doit toujours être positive et d'intensité similaire d'une bandelette à l'autre.

➤ la bande de contrôle d'amplification contient des sondes HBV universelles permettant de vérifier la présence du matériel génomique amplifié. Les intensités des autres bandes devant lui être comparées (figure 19).

La présence d'une bande clairement visible est considérée comme une réaction positive de la sonde. Et le contrôle négatif doit être parfaitement négatif, excepté pour la bande contrôle conjugué.

Une réaction positive pour au moins l'une des bandes 3, 4, ou 5 correspond au génotype A .

La positivité des bandes 6 et/ou 7 correspond au génotype B, celle des bandes 8 et/ou 9 indique le génotype C.

Le génotype D est identifié par une réaction positive des sondes correspondant aux bandes 10 et/ou 11.

Une réaction positive pour les bandes 12 et/ou 13 correspond au génotype E, quant au génotype F, il est reconnu par la positivité des bandes 14 et/ou 15.

Et en fin, la positivité de la bande 16 correspond au génotype G.

C. facteurs de risque de l'infection par le VHB

Le virus de l'hépatite B se transmet par tous les liquides et sécrétions biologiques, le plus souvent par contact sexuel et par le sang. L'hépatite B est considérée comme une maladie infectieuse extrêmement contagieuse dont les principales voies de transmission sont les contacts sexuels, les injections à risques,

la transmission de la mère à l'enfant à l'accouchement et le contact étroit avec une personne infectée.

Pour évaluer d'éventuels facteurs de risque et les modes possibles de transmission de l'hépatite B au Maroc, un questionnaire inspiré des facteurs de risque habituellement décrits pour l'hépatite B a été élaboré. Nous avons, ensuite, réalisé une étude cas-témoins en se basant sur ce qui a été rapportés dans ce questionnaire.

Les facteurs de risque traités dans cette étude varient selon le mode d'exposition. Ainsi pour les expositions liées aux soins de santé, on note les antécédents médicaux tels que : l'hospitalisation, usage de seringues en verre, les soins dentaires, la chirurgie et la transfusion sanguine.

Pour les expositions portant sur les pratiques personnelles qui pourraient être associés à l'infection, on cite : le comportement sexuel, l'histoire de piercing ou de tatouage, et la vie en ménage commun avec une personne infectée par le VHB.

Ainsi, après prélèvement de sang, tous les participants à cette étude ont rempli un questionnaire structuré pour recueillir les caractéristiques démographiques (nom, sexe, âge), et des données permettant d'évaluer les facteurs de risque éventuels recherchés dans cette étude auxquels l'exposition a eu lieu six mois avant.

Le questionnaire a été conçu pour que tous les participants puissent le compléter rapidement ; les questions étaient courtes et simples sous forme de questions à choix multiples.

Pour les sujets analphabètes, le formulaire a été lu et rempli par un médecin, pour les autres, il a été remis et rempli après le prélèvement de sang.

D. Analyse statistique

L'étude statistique a été effectuée en utilisant le test khi 2 (χ^2).

La probabilité inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) a été considérée comme seuil de significativité statistique.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

A- Prévalence de l'AgHBs

La présente étude a porté sur 16634 personnes : 10003 de sexe masculin et 6631 de sexe féminin, ayant une moyenne d'âge de 39 ans. Ces individus ont été recrutés suite au lancement, par l'Institut Pasteur du Maroc, d'une campagne de dépistage gratuit de l'hépatite B dans 15 villes marocaines, et ce en collaboration avec les établissements de santé, et les médecins de travail de différentes entreprises (Sociétés, banques, administrations...). La participation à cette étude était donc entièrement volontaire.

Des prélèvements sanguins ont été effectués chez ces participants, pour être dépistés, pour le VHB. Le dépistage a été réalisé par la recherche de l'AgHBs dans le plasma obtenu après centrifugation de prélèvement de sang pendant 20 min à 600g.

1. Traitement et analyse de données :

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

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Age minimal	Age maximal	Age moyen	Ecart type	Variance	Mode	Médiane
2 ans	80 ans	39 ans	11.97	143.22	26 ans	39 ans

Tableau 7 : Premiers résultats obtenus après exploitation des données

L'étude statistique a été effectuée en utilisant le test khi 2 (χ^2). La probabilité inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) a été considérée comme seuil de significativité statistique.

2. Dépistage de l'Ag HBs :

Le test utilisé pour la recherche de l'AgHBs, est le test immunoenzymatique de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) de 3^{ème} génération.

La technique ELISA utilisée a été faite par le Kit « Murex HBs Ag version 3 » (ABBOTT Diagnostics), qui est d'une grande sensibilité et d'une grande spécificité.

Les échantillons ayant fourni une densité optique inférieurs à la valeur seuil ($CN1 + CN2 / 2 + 0,05$) sont considérés comme initialement non réactifs dans le dosage.

Les échantillons fournissant une densité optique élevée sont considérés comme initialement réactifs dans le dosage. Ils sont réanalysés en double en utilisant le prélèvement d'origine. Les échantillons réactifs pour au moins une des réanalyses sont considérés comme réactifs de manière reproductible et présumés contenir l'Ag HBs et doivent être confirmée par le test de confirmation. Les échantillons non réactifs dans les deux puits lors de la réanalyse sont considérés comme non réactif.

Parmi les 16634 échantillons dépistés, 281 sont révélés AgHBs positifs par ce premier test, ils ont alors subi un test de confirmation.

3. Test de confirmation

Afin d'éliminer d'éventuels faux positifs pour l'Ag HBs, les 281 sérums trouvés positifs au premier test subissent un test de confirmation par le Kit Murex HBsAg confirmatory Version 3, dont le fonctionnement est basé sur l'utilisation d'un AC spécifique de neutralisation des échantillons trouvés réactifs par le test Murex HBsAg.

Un exemple de quelques résultats trouvés lors du dépistage de l'AgHBs et lors du test de confirmation est présenté dans le tableau 9.

AgHBs Murex		Confirmation Murex		Inhibition par le réactif spécifique (%)	Résultat
DO1	DO2	DO1	Test de neutralisation		
3,737	3,953	3,636	0,054	96.22	positif
3,666	3,995	3,486	0,09	95.00	positif
4,424	4,118	4,041	1,12	71.67	positif
4,058	4,545	3,898	1,236	65.47	positif
1,492	1,218	1,359	0,074	- 3.37	Négatif
4,058	4,545	3,898	1,236	65.47	positif
4,013	4,021	3,76	0,129	89.92	positif
3,853	4,172	3,861	1.081	69.24	positif
1,902	1,137	0,288	0,074	23.76	Négatif
3,952	4,328	3,707	1,298	61.94	positif
3,668	4,068	3,204	0,285	88.29	positif
3,691	4,144	3,416	1,181	65.13	positif
3.391	3.218	4,579	0,601	84.84	positif
4.022	4.450	4,578	0,156	94.74	positif
3.357	3.528	3,726	1,575	54.43	positif
3.128	2.998	3,145	0,153	92.38	positif
3.854	3.770	3,861	0,387	87.62	positif
4.027	3.999	3,831	0,252	91.13	positif
3.725	3.524	2,756	0,258	87.34	positif
3.879	4,026	3,990	1,833	50.99	positif
4,229	3,939	0,664	0,077	72.83	positif

Tableau 8 : Exemple de résultat de dépistage de l'AgHBs et du test de confirmation

Parmi ces 281 sérums, 276 ont été confirmés porteurs de l'AgHBs soit 98.22 %. Les cinq autres sérums confirmés négatifs avaient au premier test Elisa des densités optiques proches du seuil de positivité.

Donc parmi les 16634 personnes dépistés, 276 sont trouvés positifs pour l'Ag HBs (216 hommes et 60 femmes), soit une prévalence générale de l'hépatite B de 1.66%, avec un sex-ratio H/F de 1.51.

Les résultats trouvés sont résumés dans le tableau suivant :

	Effectif	Positif	Négatif	Prévalence
Homme	10003	216	9787	2,16 %
Femme	6631	60	6571	0,90 %
Total	16634	276	16358	1,66 %

Tableau 9: Prévalence générale de l'AgHBs chez les sujets dépistés.
(Chi 2= 38. 46; $p \leq 0.05$)

La prévalence obtenue (1.66%) situe le Maroc parmi les pays à faible endémicité.

4. Prévalence de l'AgHBs en fonction de la tranche d'âge

Pour l'étude de la prévalence de l'Ag HBs en fonction de la tranche d'âge, et comme il a été décrit dans plusieurs études, nous avons opté pour une tranche d'âge de 10 ans.

La prévalence de la sérologie positive à l'AgHBs à l'intérieur de chaque tranche d'âge est présentée dans la figure 20.

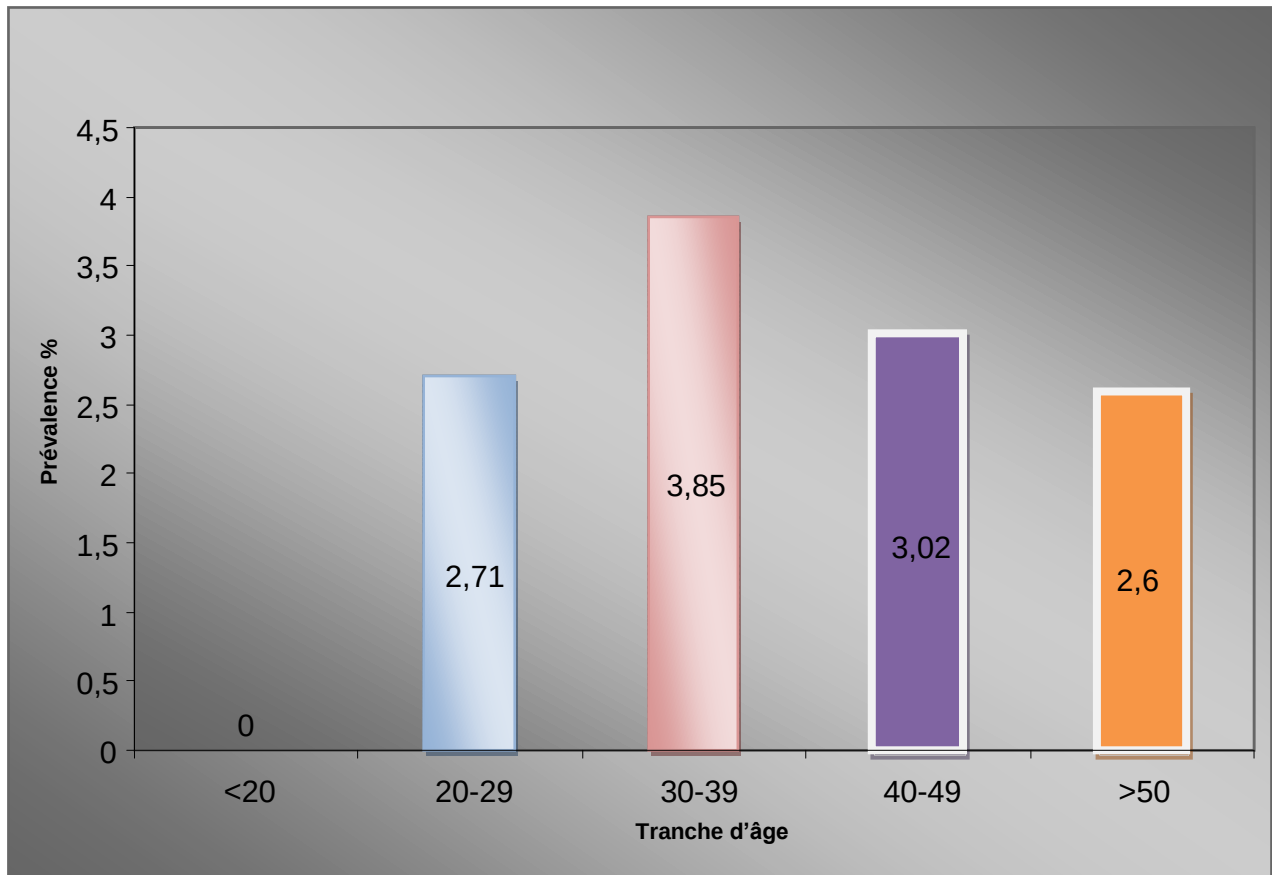


Figure 21 : prévalence de l'Ag HBs selon les tranches d'âge

L'analyse de cet histogramme montre que la répartition de la prévalence de l'AgHBs chez la population dépistée, est hétérogène selon les cinq tranches d'âges étudiées (<20 ans, 20-29 ans, 30-39 ans, 40-49 ans et >50 ans) :

Aucune infection par le VHB n'a été détectée chez les sujets âgés de moins de 20 ans. Ce ci peut être expliqué par le fait que cette tranche d'âge regroupe dans sa majorité les enfants ayant bénéficié d'une vaccination systématique dès leur jeune âge selon le programme de l'OMS.

La prévalence de l'Ag HBs a été significativement plus importante, chez les sujets âgés de 30 à 39 ans (3. 85%), suivis de très près par les personnes âgées de 40 à 49 ans (3. 02%). Ce résultat concorde avec celui de l'étude faite en France par l'Institut de veille sanitaire entre 2003-2004 (Antona 2006).

Pour les tranches d'âge 20-29 ans et >50ans les prévalences sont respectivement 2.71% et 2.6%. Ce résultat montre une diminution de la prévalence du VHB chez les personnes âgées, ce qui est similaire à celui d'une étude réalisée en 2008 au Togo (Agbenu et al 2008).

La prévalence du VHB chez les 16 634 personnes dépistées est, donc, de 1.66% avec des extrêmes allant de 0 à 3.85% selon les tranches d'âge étudiées.

5. Prévalence de l'AgHBs en fonction du sexe

Sur les 16634 personnes recrutées dans la présente étude, il y a plus d'hommes (60.14%) que de femmes (39.86%). les résultats du dépistage du VHB montrent une prévalence plus élevée de l'Ag HBs chez les hommes (figure 21).

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

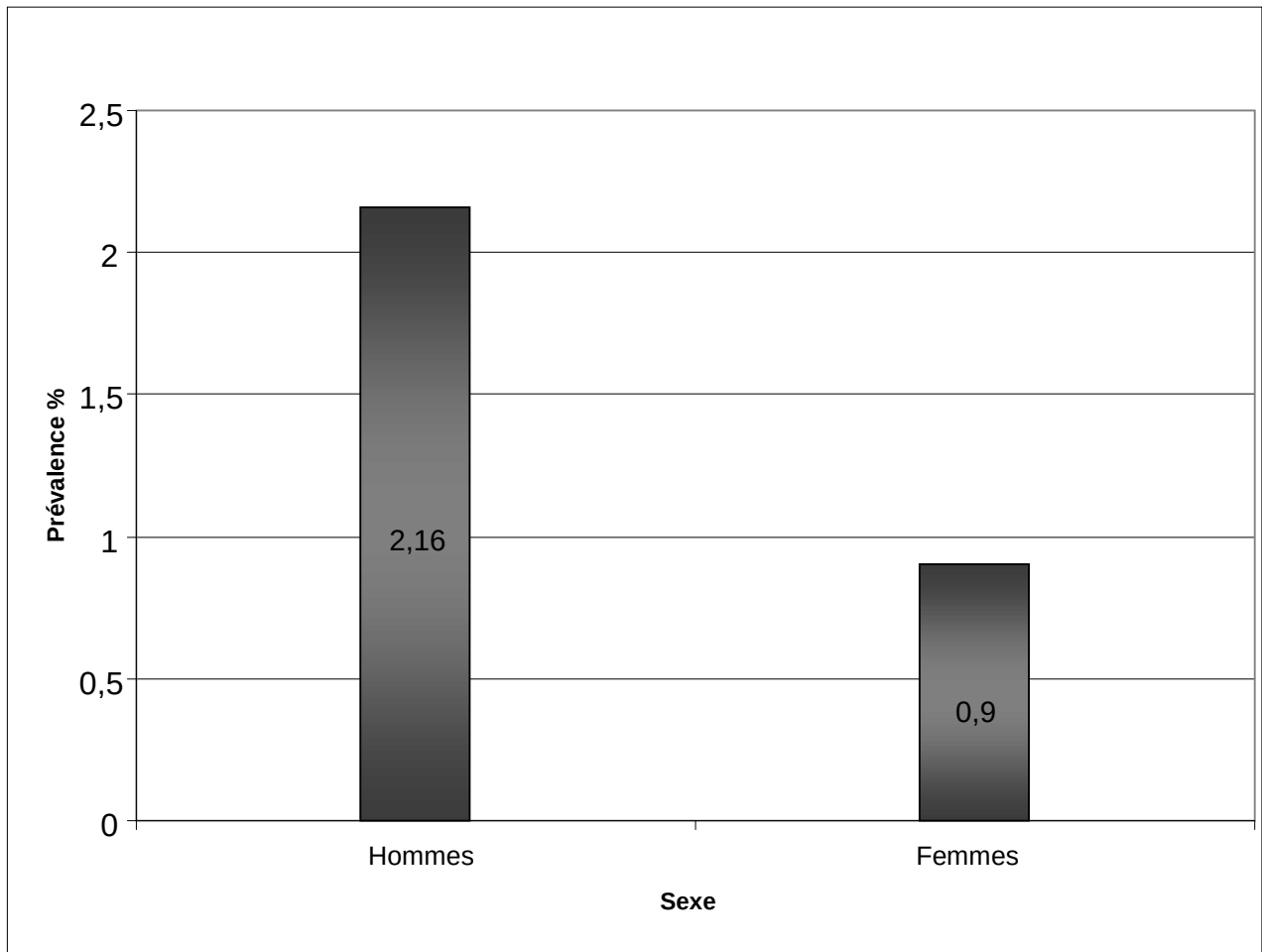


Figure 22: Répartition de la prévalence de l'Ag HBs selon le sexe

Comme le montre la figure 22, l'étude de la prévalence de l'AgHBs selon les critères d'âge et du sexe montre que la classe d'âge prédominante pour les deux sexes est celle de 30-39 ans avec une prévalence de 2,55 % chez les hommes et 1,33 % chez les femmes.

Chez les personnes âgées entre 20 et 29 ans, la prévalence de l'AgHBs est de 1.89% chez les hommes contre 0.83% chez les femmes.

Pour la tranche d'âge comprise entre 40 et 49 ans, la prévalence chez les hommes est de 2. 27% contre 0.75% chez les femmes. Quant aux sujets âgés de plus de 50 ans, on trouve toujours une prévalence élevée chez les hommes (1.83%) par rapport aux femmes (0.76%).

Donc l'étude de la prévalence de l'AgHBs selon l'âge et le sexe a montré une prédominance masculine quelle que soit la tranche d'âge avec un sex-ratio H/F de 1,5 ($\chi^2 = 38.46$, $p < 0.05$). Ces résultats réaffirment les constatations antérieures et confirment que les hommes sont plus touchés par le VHB que les femmes. En effet, des résultats similaires ont été trouvés en 2003 par Alter et al après une étude faite en Europe, en 2009 par Romano et al en Italie et en 2010 par Ben Alaya et al suite à une étude réalisé en Tunisie.

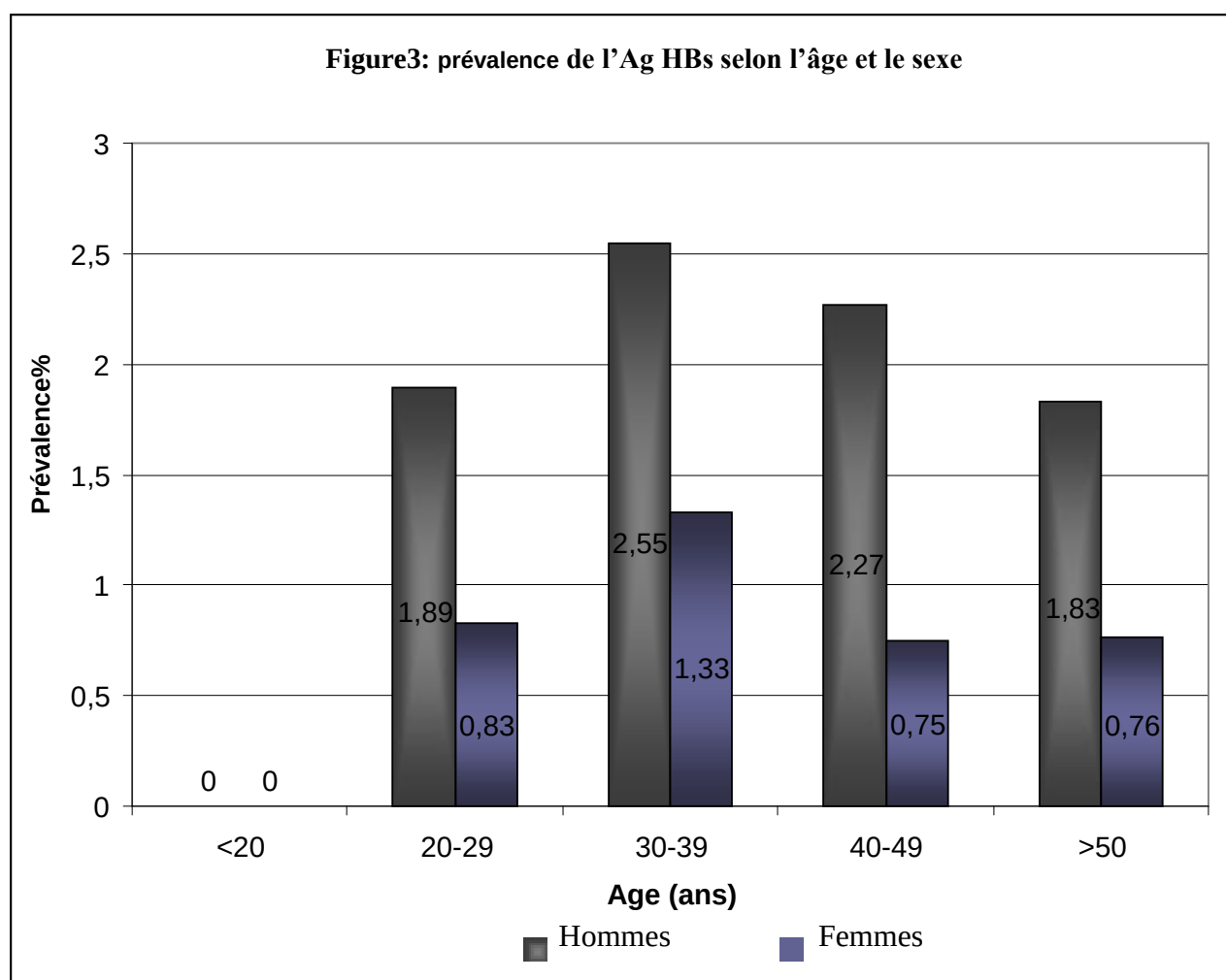


Figure 23: Prévalence de l'Ag HBs selon l'âge et le sexe

6. Recherche de l' ADN viral

Pour estimer la réplication virale chez les personnes confirmées auparavant AgHBs positif, la recherche de l'ADN viral (PCR qualitative) et sa quantification par PCR en temps réel, a été effectuées pour 200 échantillons.

Cette recherche n'a pas été réalisée chez les 76 autres personnes confirmées positives pour le VHB, à cause du manque ou de l'insuffisance des échantillons.

Ce test a été effectué en utilisant la plate forme automatisée de Roche Diagnostics : Cobas AmpliPrep et Cobas TaqMan 48, pilotés tous les deux par le logiciel AmpliLink.

Un exemple de résultat trouvé pour 30 sérums est présenté dans le tableau suivant :

N° d'échantillon	PCR qualitative	PCR quantitative (UI/mL)		N° d'échantillon	PCR qualitative	PCR quantitative (copies/mL)
1	Négative	$0,531.10^1$		16	Négative	$9,45.10^1$
2	Négative	$< 1,20.10^1$		17	Positive	$3,42.10^2$
3	Positive	$8,83.10^5$		18	Négative	$3,76.10^1$
4	Négative	$< 1,20.10^1$		19	Négative	$< 1,20.10^1$
5	Négative	$< 1,20.10^1$		20	Positive	$9,26.10^2$
6	Positive	$1,82.10^2$		21	Négative	$2,64.10^1$
7	Positive	$1,95.10^5$		22	Positive	$2,26.10^5$
8	Négative	< Seuil *		23	Positive	$4,59.10^3$
9	Positive	$2,00.10^3$		24	Positive	$1,27.10^3$
10	Positive	$4,83.10^2$		25	Positive	$1,50.10^2$
11	Positive	$4,23.10^2$		26	Positive	$1,95.10^3$
12	Positive	$4,38.10^2$		27	Positive	$1,28.10^4$
13	Négative	$0,15.10^1$		28	Négative	< Seuil *
14	Négative	$< 1,20.10^1$		29	Positive	$1,29.10^6$
15	Positive	$1,59.10^3$		30	Positive	$6,51.10^2$

Tableau 10 : Exemple de résultat de la recherche de l'ADN viral (PCR qualitative) et sa quantification par PCR en temps réel

* : seuil de sensibilité : 12 UI d'ADN VHB/mL (Soit 69,84 copies/mL).

Facteur de conversion : 1 UI = 5,82 copies.

L'analyse des résultats montre que parmi les sérums analysés, 120 (soit 60 %) ont révélé la présence d'une répllication virale active avec une charge virale comprise entre $1,59.10^1$ et $1,26.10^6$ UI/mL.

B. Génotypage VHB

Pour l'identification des génotypes du VHB, le génotypage a été réalisé sur les 120 sérums de personnes infectées (69 hommes et 51 femmes) par le virus de l'hépatite B et positifs pour l'ADN.

La technique utilisée est basée sur le principe de l'hybridation inverse à l'aide de sondes spécifiques sur bandelettes de nitrocellulose « LINE Probe Assay : LIPA». Elle a été réalisée par le test INNO-LIPA HBV Genotyping (Innogenetics) qui différencie les génotypes de A à G.

Pour ce faire, on a commencé par l'extraction de l'ADN du VHB à partir des sérums des échantillons à analyser, avant de procéder à l'amplification génique pour étudier les génotypes.

La technique d'extraction dans cette étape a été réalisée par le Kit « High Pure Viral Nucleic Acid » de Roche Diagnostics.

La deuxième étape est l'amplification de l'ADN purifié du VHB, par PCR dans la région Prés1. Elle a été réalisée en utilisant la paire d'amorce P1P2.

P1 est l'amorce sens (nt. 2823–2845: 5'-TCACCATATTCTTGGGAACAAGA-3') ; P2 est l'amorce anti-sens (nt. 80–61: 5'-TTCCTGAACTGGAGCCACCA-3').

Après l'achèvement du test INNO-LIPA HBV Genotyping, les résultats sont visuellement interprétés en confrontant les bandelettes obtenues au guide de lecture fourni, (figure 19) qui montre la localisation des différentes sondes oligonucléotidiques sur les différentes bandelettes.

La présence d'une bande clairement visible est considérée comme une réaction positive de la sonde. Et le contrôle négatif doit être parfaitement négatif, excepté pour la bande contrôle conjugué.

Des exemples de bandelettes obtenues sont illustrées dans la figure 23 ; les bandelettes 1, 3, 4, 5 et 7 représentent le génotype D, avec la présence (en plus des bandes de contrôle) de la bande 10 pour la première et la quatrième bandelette, et par la présence à la fois des bandes 10 et 11 pour les bandelettes 3, 5 et 7.

Quant à la deuxième et la sixième bandelette, elles représentent le génotype A, avec la présence, respectivement, des bandes 3 et 4, et de la bande 3.

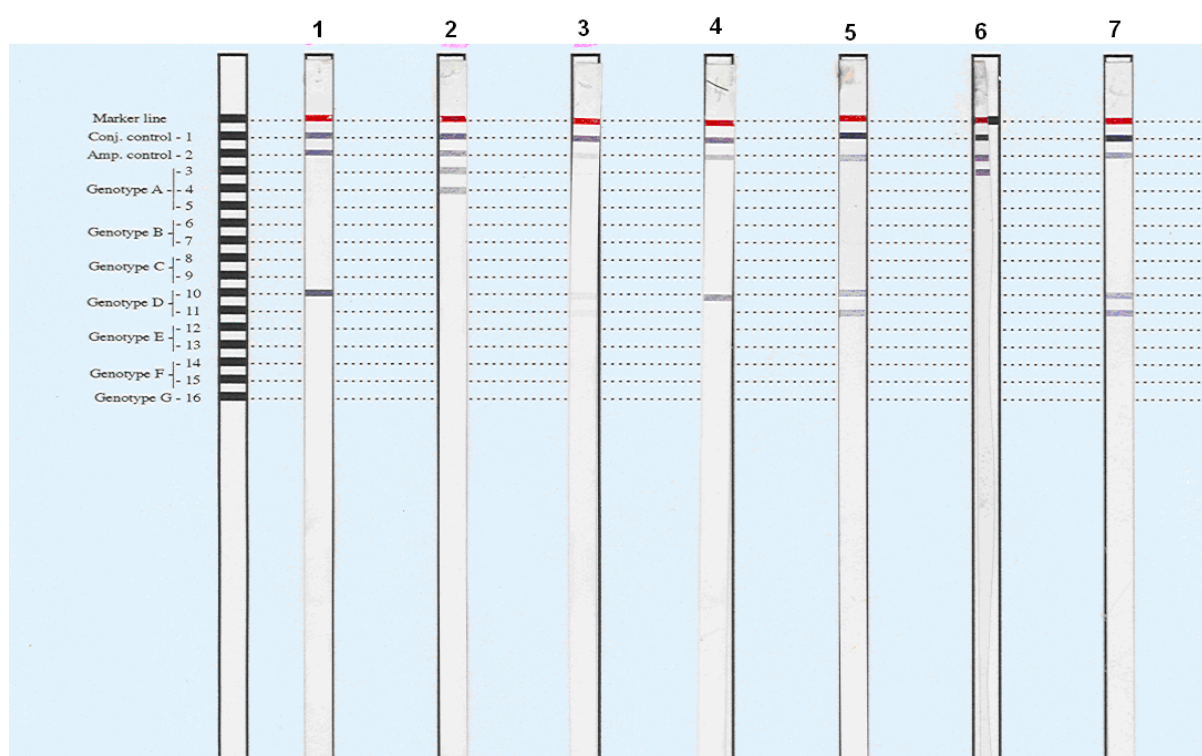


Figure 23: Exemples de résultats du test INO-LIPA trouvés dans cette étude. Les bandes 1, 3, 4, 5 et 7 illustrent le génotype D. Les bandes 2 et 6 montrent le génotype A.

Les résultats obtenus, après l'interprétation de toutes les bandelettes, ont montré l'existence de deux génotypes : le génotype D qui a été trouvé chez 116 personnes avec une prévalence de 96.6%, et le génotype A qui a été identifié chez 4 individus avec une prévalence de 3.4%.

Nous allons procéder à la comparaison de nos résultats concernant le génotypage du VHB avec ceux d'autres études marocaines, maghrébines et internationales.

Les premières données marocaines concernant le génotype du VHB en circulation au Maroc étaient celles rapportées par notre première étude en 2007 après génotypage effectués chez 40 personnes positives pour le VHB (25 hommes et 15 femmes). Nous avons identifié 39 génotypes D (97.5%) et 1 génotype A (2.5%).

La seconde étude marocaine a été menée en 2008 par Ezzikouri et al qui ont effectué le génotypage du VHB chez 77 patients (40 hommes et 37 femmes) atteints d'une hépatite chronique B. Ils étaient tous de génotype D.

En 2011, Kitab et al ont pu identifier chez des marocains, atteints d'hépatite chronique B, la présence du génotype D et du génotype A avec, respectivement, une prévalence de 90% et 10%.

Récemment, une étude (Baha et al 2012) a porté sur 221 marocains atteints d'une hépatite B chronique, les résultats ont révélé 200 génotypes D (90.45%), 13 génotypes A (5.9%), 1 génotype E (0.5%) et 7 génotypes mixtes (3.17%) (5 A/D et 2 D/F).

Une étude algérienne (Khelifa et al 2009) a inclus 75 malades (48 hommes et 27 femmes) atteints du VHB, 70 étaient de génotype D, quatre étaient de génotype A et un malade de génotype E.

Les résultats rapporté par une étude tunisienne (Ayed et al 2007) a révélé, après génotypage effectué chez 164 porteurs du VHB (117 hommes et 47 femmes), la présence d'un génotype A (0,6%), un génotype B (0,6%) , trois génotypes C (1,82%), 139 génotypes D (84,75%) et 20 génotypes mixtes (12,2%).

Les résultats rapportés par ces différentes études sont représentés par le tableau

12.

	Nombre total	Age moyen	Sexe (H/F)	Génotypes identifiés								
				A	B	C	D	E	F	G	H	mixte
Sbai et al (2007) Maroc	40	40	25/15	1 2.5%	0	0	39 97.5%	0	0	0	0	0
Ezzikouri et al (2008) Maroc	77	41	40/37	0	0	0	77 100%	0	0	0	0	0
Kitab et al (2011) Maroc	134	40.5	89/45	14 10%	0	0	120 90%	0	0	0	0	0
Baha et al (2012) Maroc	221	-	-	13 5.9%	0	0	200 90.45%	1 0.5%	0	0	0	7 3.17%
Khelifa et al (2008) Algérie	75	35	48/27	4 5%	0	0	70 93%	1 2%	0	0	0	0
Ayed et al (2007) Tunisie	164	28.5	117/47	1 0.6%	1 0.6%	3 1.82%	139 84.75%	0	0	0	0	20 12.2%
Notre étude	120	39	69/51	4 3.4%	0	0	116 96.6%	0	0	0	0	0

Tableau 11 : Comparaison des résultats de génotypage rapportés par différentes études

Les résultats de ces différentes études montrent une prédominance du génotype D dans les échantillons analysés.

Ces données concordent avec celles de la littérature qui indiquent que le génotype D est fréquent au niveau des pays du pourtour méditerranéen (Miyakawa et al 2003, Norder et al 2004, Kramvis et al 2008). En effet, la prédominance du génotype D a été confirmée en Egypte (Khaled et al 2011), en Albanie (Kondili et al 2005), en Espagne (Rodriguez-Frias et al 2006), en Italie (Medici et al 2006) et au sud de la France (Tamalet et al 2006) avec des prévalence respectives de 87%, 100%, 48.1 %, 80.4% et 45. 7% chez les population étudiées.

A part l'étude de Ezzikouri et al, le génotype A a été retrouvé dans toutes les études maghrébines suscitées (tableau 12). Sa prévalence variait entre 0.6% (Ayed et al 2007) et 10% (ktab et al 2011). La présence de ce génotype serait expliquée par son introduction à partir des pays où il est prédominant (Europe du Nord, Amérique du Nord, Afrique subsaharienne, Inde).

La présence d'autres génotypes, notamment un B et trois C en Tunisie (Ayed et al 2007), un E en Algérie (Khelifa et al 2008) et au Maroc (Baha et al 2012) pourrait correspondre à des cas isolés importés des zones où ils seraient largement répandus. En effet, le génotype E retrouvé en Algérie par Khelifa et al, a été isolé chez une personne originaire du Mali où prédomine ce type de virus.

C. Facteurs de risque de l'infection par le VHB

Pour évaluer d'éventuels facteurs de risque et des modes possibles de transmission de l'hépatite B au Maroc, un questionnaire inspiré des facteurs de risque habituellement décrits pour l'hépatite B a été élaboré.

Après prélèvement de sang, toutes les personnes ayant participé à cette étude ont rempli un questionnaire structuré pour recueillir les caractéristiques

démographiques (nom, sexe, âge), les antécédents médicaux (hospitalisation, injections, soins dentaires, chirurgie, transfusion sanguine), le comportement sexuel, l'histoire de piercing ou de tatouage, l'usage de seringues en verre, et la vie ou non en ménage commun avec une personne infectée

Nous avons réalisé une étude cas-témoins en se basant sur ce qui a été rapportés dans les questionnaires. Les individus inclus ont été répartis en deux groupes: un groupe (G1) qui comprend les 276 patients Ag HBs positif, et un groupe témoin (G2) constitué de 276 personnes choisies parmi celles trouvées négatives pour l'Ag HBs. Le groupe témoin (G2) a été apparié selon le sexe et l'âge au groupe G1.

Les facteurs de risque de l'infection par le VHB évalué chez les deux groupes (G1 et G2) sont résumés dans le tableau 13.

Facteurs de risque	Groupe cas (G1)		Groupe témoin (G2)		Khi2	p
	Nombre	Pourcentage(%)	Nombre	Pourcentage(%)		
Comportements sexuels à risque	121	43.84	40	14.49	57.53	≤0.01
Seringues en verre à usage multiple	115	41.66	91	32.97	4.46	≤0.05
Séjour à l'hôpital	73	26.44	61	22.10	1.42	≤0.30
Membre de la famille HBs positif	28	10.10	18	6.52	2.37	≤0.20
Transfusion sanguine	8	2.89	2	0.72	3.67	≤0.10
Traitement dentaire	25	9.06	30	10.86	0.5	≤0.50
Tatouage ou piercing	22	7.97	34	12.31	2.86	≤0.10
Facteur de risque non identifié	19	6.88				

Tableau 12: Facteurs de risque de l'infection par le VHB chez le groupe G1 (patients positifs pour AgHBs) et chez le groupe témoin G2.

1- Portrait global :

Chez le groupe G1 regroupant les 276 personnes retrouvées positives pour le VHB, 101 ont présenté plus d'un facteur de risque (tableau 14). Le comportement sexuel à risque est le facteur de risque le plus fréquemment rapporté, et il est également présent chez plusieurs personnes identifiant d'autres modes possibles de transmission.

En effet, parmi les personnes ayant déclaré avoir eu un ou plusieurs comportement sexuel à risque ; 16 (5.79 %) rapportent avoir utilisé des seringues en verre à usage multiple et avoir subi au moins un traitement dentaire, vingt et un individus (7.61%) soulèvent le facteur de risque lié à la transfusion sanguine, deux personnes (0.72%) rapportent avoir été transfusés et tatoués ou percés et enfin, huit personnes (2.91%) indiquent avoir été exposées à trois autres facteurs de risque qui sont : l'utilisation des seringues en verre à usage multiple, un séjour à l'hôpital et un traitement dentaire.

Comportements sexuels à risque													
Seringues en verre à usage multiple													
Séjour à l'hôpital													
Membre de la famille HBs positif													
Transfusion sanguine													
Traitement dentaire													
Tatouage ou piercing													
Facteur de risque non identifié													
Nombre d'individu	16	06	74	20	28	21	18	63	02	08	01	19	Total 276
Proportion (%)	5.79	2.19	26.81	7.24	10.15	7.61	6.52	22.82	0.72	2.91	0.36	6.88	100%

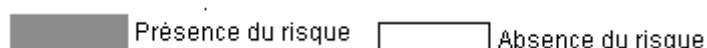


Tableau 13 : Concomitance des risques d'infection par le VHB chez la population étudiée

2- Comportements sexuels à risque

Sur les 276 personnes trouvées positives pour le VHB, 121 ont déclaré avoir eu un ou plusieurs comportements sexuels à risque, soit 43.84% contre 40 personnes (14.49%) chez le groupe témoin (tableau 13).

Donc, La différence entre les taux des facteurs de risque pour la transmission du VHB, associé à un comportement sexuel à risque est très significative entre G1 et G2 comme le montre l'analyse statistique en utilisant le Khi 2 ($\chi^2 = 57.53$, $p \leq 0,01$).

Un résultat similaire a été décrit en 2009, par Romanò et al, présentant l'exposition sexuelle à des partenaires multiples comme le facteur de risque le plus important concernant l'infection par l'hépatite B en Italie.

En 2006, Alter a précisé qu'en Europe occidentale, l'activité sexuelle à haut risque représente la plupart des cas de l'hépatite B nouvellement acquise.

La transmission sexuelle de l'hépatite B est une source majeure d'infection dans toutes les régions du monde, en particulier dans les zones à faible endémicité (Hou et al 2005), elle est liée à la présence du VHB dans le liquide séminal et les sécrétions vaginales. Le risque de contamination par voie sexuelle peut varier de 30 à 80 % pour le VHB, contre 0,1 à 10 % pour le VIH (Buffet 2005)

Hersh et al (1971) ont été les premiers à fournir la preuve de la transmissibilité du VHB par voie sexuelle, suite à l'étude de huit cas de contamination par le VHB chez des femmes, qui étaient associées à un contact sexuel avec six hommes infectés.

Le risque de transmission du VHB suite à un contact sexuel unique non protégé avec une personne infectée est de 1 à 3 % (Hadler et al 1993).

La transmission du virus d'un homme infecté à une femme est environ trois fois plus grande que dans le sens inverse, c'est-à-dire d'une femme infectée à un homme (Roumeliotou-Karayannis et al 1985).

En fin, il a été constaté que des antécédents d'infection par d'autres agents de MTS (maladies sexuellement transmissibles) ou une fréquence accrue de telles infections est un facteur de risque d'infection à VHB. Inversement, des tests sérologiques témoignant d'une infection à VHB passée ou actuelle peuvent être une indication d'autres MTS, en particulier l'infection à VIH (Hart, 1993)

3- Seringues en verre à usage multiple

Dans notre étude l'utilisation de seringues en verre à usage multiple a été décrite comme un facteur de risque important. On note que 115 (41.66%) personnes chez le groupe G1 et 91 (32.97%) chez le groupe G2 avaient utilisé ce type de seringues avec $\chi^2 = 4.46$, $p \leq 0,05$.

Le problème d'infection, par le VHB, lié aux injections à risque a été reconnu pendant plusieurs années au sein des pays en voie de développement (Simonsen et al 1999, Hauri et al 2004).

Une étude menée par l'OMS a montré qu'environ une injection sur trois est administrée par un matériel non stérile dans les pays en voie de développement. Ce chiffre est passé à 75% dans certaines parties du Moyen-Orient et du Sud Asiatique (Hutin et al 2003).

Pour les facteurs de risque suivants, la variation n'est pas statistiquement significative entre les deux groupes (G1 et G2) étudiés dans notre étude.

4- Séjour à l'hôpital :

Un séjour à l'hôpital a été noté chez 73 (26.44%) personnes positives pour le VHB, contre 61 (22.10%) appartenant au groupe témoins avec un Khi 2 = 1.42 et $p \leq 0.30$.

La possibilité de contracter le virus de l'hépatite B lors d'un séjour à l'hôpital a été soulevée en 2001 par Thibault et al, qui ont expliqué qu'une infection nosocomiale par le VHB, peut être due soit à une transmission directe du personnel soignant au patient, soit à une contamination par l'intermédiaire d'objets souillés ou mal stérilisés.

En effet, il a été estimé que, sur une période de 7 ans, un chirurgien porteur de l'Ag HBe avait un risque de 57 à 100 % de contaminer au moins un patient (Ross et al 1999).

Des cas de transmission du VHB ont été notifiés dans un protocole thérapeutique durant lequel des prélèvements sur des volontaires étaient réalisés à partir de cathéters intraveineux. La transmission s'est effectuée de patient à patient lors des prélèvements (Vickers et al 1994).

La contamination de patient à patient à cause d'un objet souillé a été, également, décrite dans les unités d'hémodialyse (Froio et al 2003) qui en constituent des sites privilégiés, car plusieurs patients se succèdent durant une même journée partageant la même chambre et le même matériel (Alavian 2010), et malgré les précautions d'hygiène, des foyers sont régulièrement décrits sans que l'on puisse toujours préciser l'acte précis qui a permis la contamination

Enfin, les biopsies sont des gestes pouvant, aussi, entraîner des contaminations nosocomiales virales du fait de leur caractère invasif (Petzold et al 1999). La contamination par le VHB a été confirmée chez 63 patients transplantés cardiaques au cours de biopsies myocardiques (Drescher et al 1994), et ce, suite à des biopsies effectuées dans une même salle successivement sur un patient porteur du VHB puis sur une personne réceptive en utilisant le même matériel.

5. Membre de la famille HBs positif

Pour le facteur de risque lié à un séjour en ménage commun avec un membre de la famille infecté par l'hépatite B, nous avons trouvé 28 (10.10%) cas chez le groupe G1 contre 18 (6.52%) chez le groupe G2, le Khi 2 dans ce cas est de 2.37 et $P \leq 1.20$.

Dans des études précédentes, la transmission intrafamiliale de l'hépatite B a été décrite précisant la possibilité de transmission du VHB entre les personnes qui partagent le même ménage.

En effet, une étude coréenne a été réalisée (Kim et al 1993) suite à l'évaluation de l'infection par le VHB chez 137 membres des familles de 51 porteurs chroniques de l'AgHBs et chez 111 personnes appartenant aux familles de 38 témoins négatifs pour les marqueurs sérologiques de l'hépatite B (VHB). La prévalence de l'AgHBs chez les individus appartenant aux familles des porteurs du VHB était de 14.1%

contre 0,0% chez ceux des témoins. La descendance des transporteurs a montré un risque significativement plus élevé d'infection par le VHB. Le partage des serviettes et mouchoirs, et récipients utilisés pour boire a été associé à un risque accru d'infection par le VHB par transmission intrafamiliale en Corée (risque relatif 11,5 pour les serviettes et mouchoirs, 12,1 pour les récipients à boire).

Nous rapportons l'observation d'une famille d'origine africaine vivant en France (Mouterde et al 1999), composée de 17 enfants, un père et deux mères. A l'occasion d'une hépatite B aigue chez un des enfants, une enquête familiale a montré que 15 enfants et les trois parents avaient été contaminés, 9 des enfants étaient porteurs d'une hépatite chronique, un enfant une hépatite aigue documentée, survenue en cours de vaccination. Un nouveau-né a pu être vacciné dès la naissance. Une transmission horizontale a donc été prouvée pour deux cas au moins dans cette famille et les enfants ne partageaient pas les coupe-ongles et les rasoirs, ne se baignaient pas dans la même eau, n'avaient pas subi de scarifications rituelles, et ne possédaient pas de brosses à dents. La seule explication paraissant pouvoir être retenue, était le partage de l'alimentation prise avec les mains dans le même plat, exposant à une contamination salivaire répétée. La transmission de l'hépatite B par la salive est encore controversée, cette observation apporte des arguments pour ce mode de contamination, favorisé par les habitudes de vie de cette famille.

Les marqueurs sérologiques de l'hépatite B (VHB) ont été déterminés chez 266 membres du ménage (G1) d'une population de femmes brésiliennes positives pour le VHB (Lobato et al 2006) et 395 membres du ménage (G2) d'une population de femmes négatives pour l'AgHBs. La prévalence globale de porteurs du VHB (HBsAg) était 21.1% pour G1 et 2.8% pour G2. La fréquence de l'AgHBs était élevée chez les frères et sœurs du groupe G1 (75%) par rapport au groupe G2 (0%).

La transmission intra-familiale du VHB est évidente dans la présente étude et est possiblement associé à la présence de plus d'un porteur du VHB dans la famille et l'utilisation partagée des brosses à dents parmi les contacts familiaux. Cette transmission intrafamiliale a été confirmée par L'analyse génotypique.

Le taux et le mode de transmission intrafamiliale de l'hépatite B (VHB) ont été récemment étudiés dans le Nord-Est de l'Egypte (Ragheb et al 2012).

L'infection par le VHB a été étudiée par des tests sérologiques et confirmée par l'analyse de l'évolution moléculaire chez les membres de la famille (N = 230) de 55 porteurs chroniques de l'hépatite B.

Le taux de l'AgHBs était plus élevé de manière significative chez les enfants des mères infectées (26,5 %) que ceux des pères infectés (4,7%) ($P = 0,0006$).

La transmission familiale du VHB a été confirmée chez cinq familles sur six, avec trois modes de transmission; maternelle, paternelle, et sexuelle.

La transmission intrafamiliale de l'hépatite B a été également décrite en Grèce (Zervou et al en 2005) et à Taiwan (Lin et al 2005 et 2007)

Il a été, aussi, montré que l'infection par le VHB est plus susceptible de se produire au sein des familles nombreuses (Alter 2006).

6- Transfusion sanguine :

Huit individus (2.89%) positifs pour le VHB et deux autres (0.72%) chez le groupe témoin, ont soulevé le facteur de risque lié à une transfusion antérieur. Mais, la variation des taux entre ces deux groupes n'est pas statistiquement significative : le Khi 2 est de 3.67 avec $p \leq 0.10$.

Malgré l'amélioration technique continue pendant le dépistage des dons de sang, l'hépatite B reste un risque majeur de transmission de l'infection virale suite à une transfusion sanguine (Candotti et al 2009).

En effet, le risque de transmission du VHB par transfusion des produits sanguins labiles a été estimé en France à 1 pour 400 000 dons sur la période 2000–2002 , soit six dons potentiellement infectés par an (Pillonel et al 2004).

Aux États-Unis, le risque résiduel de transmission du VHB calculé sur la période 2000–2001 a été estimé à 1 pour 205 000 dons de sang (Dodd et al 2002).

Quant au Sénégal, cette transmission a été estimée à un pour 976 dons sur la période 2003 à 2005, soit 14 dons infectants chaque année (Touré-Fall et al 2009).

7. Traitement dentaire

Dans cette étude, la différence entre les taux des facteurs de risque pour la transmission du VHB, associé aux soins dentaires n'est pas significative entre les deux groupes G1 et G2 comme le montre l'analyse statistique. Dans ce cas, on a noté 25 cas chez le groupe G1 soit 9.06% et 30 cas chez G2 soit 10.86 %. Le Khi2 est de 0.5 avec $p \leq 0.50$.

Le risque potentiel de transmission du VHB suite à un traitement dentaire a été décrit dans la littérature, mais les causes de cette transmission étaient différentes d'une étude à l'autre.

Selon une étude réalisée par Rimland et al en 1977, cinquante-cinq patients ont été contaminés par un dentiste positif pour le VHB et qui ne portait pas de gants durant son travail. La notion de coupures répétées sur ses mains évoque un mode de transmission directe de sang dans la cavité buccale. Aucun cas n'a pu être dépisté après que le port de gants ait été recommandé.

En France, Le risque individuel moyen d'avoir contracté une infection au VHB, suite à des soins dentaires, à cause de l'absence de stérilisation des porte-instruments rotatifs entre chaque patient, a été estimé en 2009 à 1/516 000 contre 1/420 millions pour le VIH (Thiolet 2009)

Un cas de transmission du VHB, de patient à patient, lors des soins dentaires a été identifié aux Etats-Unis. Selon les auteurs, cette transmission était probablement due au non respect des bonnes pratiques de stérilisation (Redd et al en 2007).

En fin, d'après l'étude réalisée par Arboleda et al en 1995, aucun cas de transmission du VHB n'a été identifié en dehors du traitement par un dentiste non-professionnel. Les personnes ayant été traitées par des dentistes non-professionnels étaient 2,6 fois plus souvent infectées par le VHB que celles qui avaient reçu un traitement dentaire par des professionnels qualifiés.

8. Tatouage et/ou piercing

Concernant le facteur de risque pour la transmission du VHB, associé aux tatouage et/ou piercing, 22 cas (7.97%) ont été décrit dans notre étude, mais la différence entre les deux groupes étudiés G1 et G2 est statistiquement non significative.

La transmission du VHB, lors du tatouage et du piercing, est essentiellement liée à l'usage de matériel souillé par le sang d'une personne infectée et sa réutilisation sur une personne jusqu'alors indemne. La pratique de tatouage et de piercing peut, donc, représenter un facteur de risque si les conditions d'hygiène n'ont pas été respectées.

Le tatouage et le piercing ont été décrits comme facteurs de risque importants (46 %) pour la transmission de l'hépatite B lors d'une étude réalisée en 2000 par Michault et al chez 100 détenus.

Pour l'évaluation de l'association entre le tatouage et le risque de transmission du virus de l'hépatite B, Jafari et al ont procédé à un examen systématique et à une méta-analyse par la recherche systématique dans les bases de données MEDLINE, EMBASE, PubMed, DARE (Database of Abstracts of Reviews of Effects), ACP

Journal Club et BIOSIS Previews jusqu'en mars 2011 (Jafari et al 2012). Quarante-deux études observationnelles étaient comprises dans l'examen systématique, dont 31 ont été incluses dans la méta-analyse. Les résultats de l'examen systématique et de la méta-analyse montrent que le tatouage est associé à la transmission de l'hépatite B dans tous les sous-groupes analysés, avec une plus forte association entre le tatouage et le risque d'hépatite B dans les populations s'adonnant à des comportements à risque.

9. Facteurs de risque non identifiés

Dans la population étudiée, aucun facteur de risque n'a été identifié chez 19 (6.88%) personnes infectées par le VHB.

Suite à une étude antérieure, il a été décrit que les facteurs de risque ne peuvent pas être déterminés pour près de 25 % des infections aiguës par le VHB (Boulos et al 2005).

CHAPITRE 4

DISCUSSION GENERALE

L'hépatite virale B est très contagieuses, en moyenne 10 fois plus que l'hépatite C et 100 fois plus que l' HIV, comptant pour 1,2 million de décès chaque année dus à l'hépatite chronique, cirrhose et carcinome hépatocellulaire (Abedi et al 2011). C'est la maladie sexuellement transmissible la plus répandue dans le monde : on estime à deux milliards le nombre de personnes ayant été exposées au virus de l'hépatite B. Chaque année, près de 10 à 30 millions de nouvelles contaminations se produisent. Des deux milliards de personnes infectées, au moins 350 millions sont des porteurs chroniques constituant un réservoir permettant la continuité de la transmission virale (Denise 2006).

La répartition géographique mondiale de l'hépatite B est très variable, elle délimite trois catégories géographiques en fonction de la prévalence de l'AgHBs.

Les zones de forte endémicité correspondent à une prévalence de l'AgHBs supérieur à 8 % telle l'Afrique sub-saharienne, l'Asie du Sud-Est et l'Extrême-orient.

Les zones d'endémicité intermédiaire où la prévalence de l'AgHBs est comprise entre 2 et 8%, elles recouvrent le pourtour méditerranéen, l'Europe de l'Est et l'Amérique Latine.

Les zones de faible endémicité où la prévalence de l'AgHBs est inférieure à 2%, elles sont représentées essentiellement par l'Europe de l'Ouest, l'Amérique du Nord et le Japon.

Les enquêtes de séroprévalence sont d'un grand intérêt pour mesurer la prévalence d'une infection chronique par le VHB, et déterminer le nombre de personnes touchées qui devront être prises en charge par le système de soin et/ou qui représentent une source potentielle de transmission.

Rares sont les études qui ont été faites pour estimer la prévalence du VHB au Maroc. Ces études ont été réalisées chez les donneurs de sang (Mrani et al 2002) et

chez les professionnels de santé (Djjeriri et al 2008), avec des prévalences estimée respectivement à 2.5% et 1%.

Egalement, deux études ont été réalisées en 2005 et 2009 (Boulaajaj et al 2005, Atitar et al 2009) chez des malades à risque ; les prévalence d'infection par le VHB trouvées sont respectivement ; 2% et 15.8%.

Cependant, les différents groupes étudiés durant ces études ne représentent pas l'ensemble de la population Marocaine. C'est pour cette raison que l'objectif principal de la présente étude était d'estimer le niveau d'infection à VHB au Maroc par le dépistage d'un nombre élevé de personnes pour l'AgHBs.

C'est dans ce sens qu'une campagne de dépistage gratuit de l'hépatite B a été lancée, dans 15 villes marocaines (Rabat, Salé, Kenitra, Casablanca, Eljadida, Mohammedia, Khouribga, Benslimane, Berrechid, kalaat sraghna, Safi, Settat, Béni Mellal, Marrakech et Agadir).

Au niveau de chaque ville, cette campagne de dépistage du VHB a été menée par l'Institut Pasteur de Casablanca en collaboration avec les établissements de santé, et les médecins de travail de différentes entreprises (Sociétés, banques, administrations...). La participation à cette étude était entièrement volontaire.

Suite au lancement de cette campagne de dépistage, 16634 personnes ont pu être recrutées pour l'étude. Des prélèvements sanguins ont été effectués chez ces participants pour être dépistés, pour une infection éventuelle par le VHB. Sont exclues de l'étude les personnes déjà connues porteuses de ce virus.

Les résultats du dépistage de l'antigène HBs et celui de la confirmation réalisés par le test immunoenzymatique de type Elisa de troisième génération, montrent que seules 276 personnes sont trouvées positives pour le VHB.

Ces résultats obtenus situent le Maroc parmi les pays à faible endémicité avec une prévalence du portage de l'AgHBs estimée actuellement à 1,66% dans la population active.

Or, avant l'introduction du vaccin contre l'hépatite B dans le programme élargi de vaccination (PEV), le Maroc était un pays considéré, Selon les données de l'OMS, comme ayant une prévalence intermédiaire de l'hépatite B.

En plus, l'étude comparative réalisée par André en 2000, entre différents pays du monde (Moyen Orient, Japon, Chine, Afrique subsaharienne et Afrique du Nord) a montré que la plupart des pays africains, tel que le Sénégal et l'Egypte, ont une endémicité élevée sauf le Maroc et la Tunisie qui font partie des zones d'endémicité intermédiaire.

Donc, les résultats rapportés dans cette étude montre que le Maroc est passé d'une endémicité intermédiaire pour l'hépatite B, à une faible endémicité.

Cette baisse de la prévalence de l'hépatite B peut être expliquée par le succès du programme national de vaccination contre le VHB. En effet, le Maroc fait partie des pays qui ont adhéré au programme de l'OMS pour la vaccination contre le VHB depuis 1999. En plus, il a été décrit, qu'au Maroc, la couverture vaccinale des enfants de moins de 1 an est passée de 33% en 2000 à 93% en 2005 (Barkat et al 2008).

Le résultat de notre étude est en accord avec les données rapportées en Tunisie, qui montrent une baisse de la prévalence de l'AgHBs en raison de l'amélioration des conditions sanitaires locales et la systématisation de la vaccination contre l'hépatite B depuis 1995 (Ben Amora et al 2009).

Une baisse spectaculaire du taux d'infection par le VHB a été, également, réalisée en Asie Pacifique et en Afrique subsaharienne suite à l'introduction du

vaccin contre l'hépatite B dans le programme national de vaccination. Le taux d'infection dans ces pays est passé de 8% à 1% (Lavanchy 2004).

De même pour les Etats-Unis où l'incidence a diminué de 78% entre 1990 et 2005 passant de 8,5 à 1,9 pour 100 000 habitants (Mast et al 2006).

Dans la présente étude, la prévalence de l'AgHBs selon les critères d'âge et du sexe (figure 22), montre que la classe d'âge prédominante pour les deux sexes est celle de 30-39 ans (2,55 % chez les hommes et 1,33 % chez les femmes).

Chez les personnes âgées entre 20 et 29 ans, la prévalence de l'AgHBs est de 1.89% chez les hommes contre 0.83 chez les femmes.

Pour la tranche d'âge 40-49 ans, la prévalence chez les hommes est de 2. 27% contre 0.75% chez les femmes. Quant aux sujets âgés de plus de 50 ans, on trouve toujours une prévalence élevée chez les hommes (1.83%) par rapport aux femmes (0.76%).

Donc, l'étude de la prévalence de l'AgHBs selon l'âge et le sexe a montré une prédominance masculine quelle que soit la tranche d'âge avec un sex-ratio H/F de 1,5 ($\chi^2 = 38.46$, $p < 0.05$). Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par une étude menée en Italie (Romano et al 2009), ce même résultat a été trouvé auparavant par Alter et al en 2003, par shepard et al et par Zarski en 2006.

Mais, on note surtout que la répartition de la prévalence de l'AgHBs chez la population dépistée, est hétérogène selon les cinq tranches d'âges étudiées (<20 ans, 20-29 ans, 30-39 ans, 40-49 ans et >50 ans).

Aucune infection par le VHB n'a été détectée chez les sujets âgés de moins de 20 ans. Ce ci peut être expliqué par le fait que cette tranche d'âge regroupe dans sa majorité les enfants ayant bénéficié d'une vaccination systématique dès leur jeune âge selon le programme de l'OMS.

La prévalence de l'Ag HBs a été significativement plus importante, chez les sujets âgés de 30 à 39 ans (3. 85%), suivis de très près par les personnes âgées de 40 à 49 ans (3. 02%). Pour les tranches d'âge 20-29 ans et >50ans les prévalences sont respectivement 2.71%et 2.6%

On conclut donc, que la classe d'âge prédominante pour les deux sexes est celle de 30-39 ans (figure 20), ce qui concorde avec les résultats de l'étude faite en France par l'Institut de veille sanitaire entre 2003-2004 (Antona 2006). Une étude faite en 2001 a soulevé, également, notre constatation en rapportant que la prévalence de l'infection par le VHB est plus élevée chez les patients jusqu'à l'âge de 40 ans (Castolo et al 2001). En 2007 Alam et al ont noté une infection significativement plus élevée chez les personnes âgées entre 21 et 40 ans, suivie par 41 à 60 ans.

Par ailleurs, nous avons montré que la prévalence du VHB diminue chez les personnes âgées, cette diminution est probablement due à une moindre activité sociale et limite des contacts personnels. Nos résultats sont cohérents avec ceux de Khan et al qui ont confirmé en 2011, que le taux d'infection par le VHB est plus élevé chez les jeunes, en raison de leurs plus grandes expositions et leur interaction au sein de la société par rapport aux enfants et aux personnes âgées. Nos résultats sont aussi en concordance avec l'étude de Abedi et al en 2011 qui suggèrent un rôle important de la transmission horizontale.

Le génotypage réalisé sur les 120 sérums de patients infectés par le virus de l'hépatite B et positifs pour l'ADN, par le test Lipa (Line Probe Assay) basé sur le principe d'hybridation inverse, a montré l'existence de deux génotypes: le génotype D (96,6%) et le génotype A (3,4 %). Ce résultat montre que le génotype D prédomine dans les échantillons analysés dans cette étude, ce qui confirme les résultats trouvés

lors de notre étude en 2007, et rejoint ceux de Kitab et al en 2011 qui ont pu identifier chez des marocains atteints d'hépatite B chronique la présence du génotype D et du génotype A avec, respectivement, une prévalence de 90% et 10%.

Ces données concordent aussi avec celles de la littérature qui indique que le génotype D est fréquent au niveau des pays du bassin méditerranéen (Norder et al 2004, Kramvis et al 2005).

La répartition des types de VHB à travers le monde est ubiquitaire. Mais puisque les génotypes reflètent l'évolution du VHB, leur distribution géographique n'est pas homogène. Les mouvements de populations, qui tendent à s'accroître favorisent les mélanges de génotypes. Ainsi, vu la zone géographique qu'occupe le Maroc, les génotypes A retrouvés chez quatre de nos patients nous amènent à explorer l'hypothèse d'une possible importation du virus de l'hépatite B de l'une des zones où prédomine ce génotype (tableau 5).

Les génotypes du VHB ont une distribution géographique distincte et influencent le résultat clinique de l'hépatite B y compris le risque du CHC (McMahon 2009).

Dans la littérature, le rôle des génotypes A et D dans la progression de la maladie reste controversé ; certaines études ont suggéré que le génotype D était associé à une évolution plus grave de l'infection, alors que d'autres suggèrent qu'il évolue plus lentement vers l'hépatite chronique.

En effet, selon une étude réalisée par Mayerat et al en 1999, le génotype D avait un faible pouvoir cancérigène. Cependant, des résultats tout à fait différents ont été trouvés par d'autres études (thakur et al 2002, Toan et al 2006) selon lesquelles, le génotype D était associé à une atteinte hépatique sévère par rapport au génotype A et serait un facteur prédictif d'évolution vers le CHC.

Au Maroc, où le génotype D est prédominant, seulement 12.8% des malades qui ont une tumeur hépatique sont porteur d'Ag HBs (Zekkouri et al 2007).

Et en fin, aucun lien n'a été retrouvé entre les génotypes A et D, et la sévérité de l'infection d'après une étude transversale réalisée par Halfon et al en 2002.

De manière générale, l'impact exact des génotypes A et D sur l'évolution de l'hépatite B est loin d'être établi, ce qui nécessite beaucoup plus d'études dans ce sens.

Par contre, en Asie qui est une zone de forte endémie, la majorité des études ont porté sur les génotypes B et C, puisqu'ils y sont les plus dominants. Suite à ces études, il a été démontré d'une façon pertinente et bien fondée qu'il existe une corrélation entre ces deux génotypes et l'évolution de l'hépatite virale B.

En effet, suite à deux études (chinoise et japonaise), il a été montré que le génotype B progresse plus lentement vers la cirrhose et le CHC que le génotype C (Ding et al et Orito et al, 2001).

Une autre étude chinoise (Chan et al 2009), ayant porté sur la comparaison du degré de fibrose dans les deux génotypes (B et C), a montré que 42% des malades de génotype C contre 55% de génotype B avaient une fibrose minime alors que 25% contre 19% avaient une fibrose avancée.

Il a été, aussi, démontré qu'au Taiwan (Kao et al 2000), la survenue du CHC est associée à un âge précoce dans le génotype B et tardif dans le génotype C qui est caractérisé par une atteinte hépatique plus sévère.

Par ailleurs, le suivi régulier, sur plusieurs années, de 1536 malades porteurs du VHB (Livingston et al 2007) a montré que le génotype peut avoir un effet important sur l'évolution de la maladie. En effet, on a remarqué que le génotype C garde, au fil

du temps, un risque de développement de CHC plus élevé, alors que le génotype F était associé à la survenue de CHC à un âge précoce.

En conclusion, on peut dire qu'il s'avère évident que le génotype a un effet non négligeable sur le profil évolutif de l'hépatite virale B.

L'influence des génotypes du VHB sur la réponse au traitement antiviral a été également étudiée. Les génotypes A et B ont été associés à une meilleure réponse à l'interféron par rapport au génotypes C et D (Raimondi et al 2010).

Le virus de l'hépatite B se transmet par tous les liquides et sécrétions biologiques, le plus souvent par contact sexuel et par le sang. L'hépatite B est considérée comme une maladie infectieuse extrêmement contagieuse. Les principales voies de transmission sont les contacts sexuels, les injections et transfusions à risques, la transmission de la mère à l'enfant à l'accouchement et le contact étroit avec une personne infectée.

En se basant sur ces différents critères, un questionnaire inspiré des facteurs de risque habituellement décrits pour l'hépatite B a été élaboré dans le but d'évaluer les facteurs de risque et les modes possibles de transmission de l'hépatite B au Maroc.

Ce questionnaire structuré a permis de recueillir, chez tous les participants à cette étude, les caractéristiques démographiques (nom, sexe, âge), ainsi que des facteurs de risques liés aux soins de santé (hospitalisation, usage de seringues en verre, soins dentaires, chirurgie, transfusion sanguine), et ceux liés à des pratiques personnelles (le comportement sexuel, histoire de piercing ou de tatouage, et la vie ou non en ménage commun avec une personne infectée par le VHB).

D'après la réponse à ce questionnaire, aucune personne des 276 positives pour le VHB n'a été infectée suite à une exposition prénatale.

Comme il a été trouvé dans d'autres études (Siegel et al 1995, Alter 2006, Odusanya et al 2007, Romanò et al 2009), nous avons constaté que le comportement sexuel à risque est un facteur de risque important pour la transmission de l'infection par le VHB (43.84% pour G1 et 14. 49 % pour G2, $\chi^2=57.53$, $p\leq 0.01$).

En 2000, Meheus a affirmé qu'en Europe occidentale, la transmission de l'hépatite B se fait principalement par voie sexuelle, qui est un mode de transmission du VHB caractérisant les zones de faible endémicité, mais qui est de plus en plus important, dans les zones de fortes endémicités où les jeunes commencent à adopter un mode de vie occidental.

Un autre facteur de risque important est l'utilisation de seringues en verre à usage multiple, nous avons noté dans cette étude que 115 personnes (41,66%) chez le groupe G1 et 91(32. 97%) chez le groupe G2 ($\chi^2= 4. 46$, $p\leq 0.05$); avaient utilisé ce type de seringues pour l'administration des injections thérapeutiques; ils étaient tous âgés de plus de 40 ans. L'utilisation de seringues en verre à usage multiples non stérilisées, peut expliquer la présence de l'infection par le VHB au cours des dernières décennies, avant une disponibilité suffisante de seringues à usage unique.

Cette étude indique que le facteur de risque lié à la vie en ménage commun avec une personne infectée même sans contacts sexuels est de 10,1 % chez le groupe G1. Dans des études précédentes, il a été montré que le virus de l'hépatite B peut être transmis entre personnes vivant sous le même toit (Dumpis et al 2001, Kao et al 2002, Chakravarty et al 2005),

Outre la transmission intra-familiale, d'autres facteurs de risque non identifiés à ce jour doivent être responsables du nombre élevé de cas d'hépatite B (Roggendorf

et al 2003), c'est le cas dans la présente étude des 19 personnes (6,88%) qui ne présentaient pas de facteur de risque identifiable.

Étant donné que le VHB peut survivre sur les surfaces de l'environnement pendant plus d'une semaine, l'exposition indirecte au virus peut se produire par l'intermédiaire d'objets contaminés inanimés. Le risque du partage des objets réside dans la possibilité que les objets à usage personnel contaminés; par exemple: brosses à cheveux, peignes, rasoirs et brosses à dents, peuvent endommager la peau ou des muqueuses et transmettre le VHB. Ce type de transmission horizontale se produit principalement dans les zones de forte endémicité et dans des conditions d'hygiène insuffisantes (Ben-Alaya-Bouafif et al 2010). Cela Peut survenir à la maison ou à l'extérieur, par exemple avec des amis ou dans des camps sportifs (André 2000).

Dans la pratique quotidienne, la salive n'est pas considérée comme un important mode de transmission de l'hépatite B. Cependant, la transmission du VHB après une morsure ou un crachat dans l'œil est décrite et la salive peut être une source de quantités considérables de l'ADN du virus (Van der Eijk et al 2004). En plus, d'autres études ont confirmé la présence de l'AgHBs dans plusieurs autres fluides corporels tels que le sperme (Yang et al 2009), l'urine, le pancréas, les sécrétions biliaires (Kidd-Ljunggren et al 2006) et le lait maternel (De Oliveira et al 2009).

Un long séjour à l'hôpital représente également un facteur de risque important de transmission du VHB; c'est le cas de 73 personnes (26,44%) dans la présente étude. En effet, il y a plusieurs aspects qui déterminent le risque de transmission du VHB par les travailleurs des soins de santé aux patients pendant les procédures chirurgicales invasives, parmi lesquels on note la prévalence du VHB dans le personnel médical (Roggendorf et al 2003) et le non-respect des techniques

aseptiques et des pratiques de contrôle recommandées qui ont été conçues pour prévenir les infections post-opératoires, en raison de la contamination croisée de l'équipement et des dispositifs médicaux.

Les données disponibles indiquent que le risque de transmission du VHB du personnel médical infecté aux patients est beaucoup plus élevé que pour d'autres virus tel que l'hépatite C ou le VIH (Roggendorf et al 2003).

L'hépatite B peut aussi être transmise via des pratiques d'injection thérapeutiques dangereuses, y compris les aiguilles et les instruments médicaux mal stérilisés, la réutilisation d'aiguilles et seringues jetables, en plus de la contamination des flacons de médicaments à doses multiples (Alter 2006). Toutefois, ces pratiques sont actuellement interdites au Maroc.

Dans cette étude, un antécédent de transfusion a été retrouvé chez 8 personnes (2,89%), mais la variation des taux entre les deux groupes étudiés G1 et G2 n'est pas statistiquement significative ($\chi^2 = 3.67$, $p \leq 0.10$).

Cependant, la transfusion sanguine n'est pas un acte anodin, elle doit obéir à des règles particulières de sécurité. Ainsi, tout produit sanguin labile (PSL) administré doit répondre aux normes de sécurité virales des PSL. Cette sécurité virale n'a cessé de s'améliorer au cours des 15 dernières années. Toutefois, il persiste encore un risque résiduel (RR) de transmission des virus dont les marqueurs sont systématiquement dépistés.

Selon des études antérieures, ce risque résiduel de transmission du virus de l'hépatite B est de 1 pour 400 000 dons en France sur la période 2000–2002 (Pillonel et al 2004), de 1 pour 205 000 dons de sang aux Etats Unis sur la période 2000–2001 (Dodd et al 2002) et de 1 pour 976 dons au Sénégal sur la période 2003 à 2005 (Touré-Fall et al 2009).

Actuellement, la transmission du VHB via la transfusion ou la transplantation a été virtuellement éliminée dans les pays dont les donneurs sont dépistés pour l'AgHBs (Alter 2006); c'est le cas du Maroc. Mais il est possible que, dans une phase très récente d'infection par le VHB, les donneurs de sang AgHBs négatifs soient capables de transmettre le virus. Ce risque est lié aux dons prélevés pendant la fenêtre silencieuse qui précède l'apparition des marqueurs biologiques de l'infection, ou pendant la phase de pré-séroconversion d'une infection récente qui se caractérise par un taux d'AgHBs, présents dans la circulation, inférieur aux limites de détection. La mise en œuvre de tests moléculaires (test d'acide nucléique) ou d'une plus grande sensibilité des tests AgHBs pourrait réduire davantage le risque de transmission du VHB par transfusion sanguine (Busch 2004, Almeida et al 2006, Liu et al 2006, Niederhausera et al 2008).

Enfin, de nombreux cas de transmission du VHB lors de greffes rénales ou hépatiques ont été décrits, lorsque le donneur était porteur de l'Ag HBs, mais on retrouve aussi des cas de transmission alors que le donneur ne présentait que des Ac anti-HBc (Salvadori et al 2011).

Dans la présente étude, 22 (7.97%) personnes atteintes de VHB étaient tatouées ou percées ; le tatouage et l'acupuncture sont aussi des voies possibles d'infection sauf si les aiguilles utilisées sont stériles. Des flambées occasionnelles de l'hépatite B, ont été associées à l'acupuncture et le tatouage (Limentani et 1979, Kent et al 1988).

Ce résultat est confirmé par une étude réalisée sur 100 détenus pendant laquelle, le tatouage et/ou piercing a été décrit comme facteur de risque important pour la transmission de l'hépatite B (Michault et al 2000).

Autres sources de transmission probable de VHB trouvées dans des études précédentes, étaient les interventions dentaires (Mast et al 1999, Wu et al 1989). Une association positive entre l'histoire d'un traitement dentaire avec un chirurgien dentiste non qualifié a été trouvé (Arboleda et al 1995), ce qui peut expliquer le cas probable des 25 personnes (9.06%) de notre étude.

En l'absence de stérilisation des porte-instruments rotatifs entre chaque patient lors des soins dentaires, le risque individuel moyen d'avoir contracté une infection au VHB a été estimé en France à 1/516 000 contre 1/420 millions pour le VIH (Thiolet 2009)

Enfin, Il n'y a pas de preuves fiables que des infections aéroportées se produisent, et les excréments ne sont pas du tout une source d'infection par l'hépatite B. Le VHB n'est transmis ni par les aliments contaminés ni par l'eau ni par les insectes (Hou et al 2005).

CONCLUSION GENERALE

L'épidémiologie du virus de l'hépatite B (VHB) n'est pas connue avec précision au Maroc. La présente étude a permis d'estimer le niveau d'infection à VHB par le dépistage d'un nombre élevé de personnes (16 634) pour l'AgHBs. Cette approche est d'importance pour la détermination des porteurs chroniques du VHB qui va permettre de détecter la maladie à un stade précoce, augmentant ainsi les chances de guérison ou de stabilisation, car plusieurs personnes séropositives ne présentent aucun symptôme pendant des années, alors que le virus continue à se multiplier et à induire des lésions dans le foie, jusqu'à un stade de complications parfois graves qui se manifesteront tardivement.

Ce dépistage va, aussi, permettre d'éviter d'autres contaminations en incitant les individus identifiés porteurs de ce virus, de prendre des dispositions pour éviter de contaminer d'autres personnes.

L'évaluation de la prévalence du VHB va permettre aussi de suivre l'évolution du virus à l'échelle nationale. Cette prévalence est estimée actuellement, d'après cette étude, à 1,66% ce qui situe le Maroc parmi les pays à faible endémicité.

Notre étude indique aussi que le génotype D prédomine au Maroc, ces données sont d'un grand intérêt pour le diagnostic et le pronostic ainsi que pour la décision thérapeutique.

La présente étude s'est penchée également sur l'évaluation des facteurs de risque de l'hépatite B chez les personnes positives pour l'AgHBs. L'utilisation du questionnaire structuré indique que les comportements sexuels à risque sont parmi les principaux facteurs de risque de transmission du VHB.

Ce résultat est d'une grande importance pour les stratégies de prévention, d'où la nécessité de renforcer les programmes d'information d'éducation et de

communication en matière de VHB et de toutes les maladies sexuellement transmissibles.

La prévention de l'hépatite B doit faire l'objet d'actions d'amélioration qui nécessitent une stratégie nationale et une mobilisation pluridisciplinaire et pluri-professionnelle pour organiser les filières de prise en charge.

La stratégie devrait inclure un programme de ciblage des efforts de prévention du VHB, y compris la sensibilisation du public et la définition des exigences en matière de sécurité et de la promotion des normes de contrôle des infections dans les établissements de soins.

La surveillance de l'hépatite B est complexe en raison de la diversité des sources de contamination par le VHB, de la fréquence des infections asymptomatiques, de la variabilité du tableau clinique de la maladie et du coût élevé des tests diagnostiques. Malgré ces difficultés, la surveillance peut être utile pour définir l'épidémiologie de toutes les formes de l'hépatite virale B et identifier les groupes à haut risque, qui bénéficieront des mesures de prévention, ce sont : les nouveau-nés de femmes séropositives pour le VHB, les personnes en contact avec un sujet porteur de l'Ag HBs, les professionnels de santé, les hémodialysés, les polytransfusés, les candidats à une greffe, les personnes ayant des partenaires sexuels multiples, la population migrante ou voyageur en provenance de pays de forte endémie, les usagers de drogues par voie parentérale (intraveineux ou per-nasal), les détenus et les personnes infectées par le VIH ou le VHC ou une autre infection sexuellement transmissible. .

Le traitement actuel de l'hépatite chronique B a une efficacité relativement faible à long terme et un prix très élevé. Ainsi, La prévention demeure la méthode la plus

efficace pour contrôler avec succès l'infection par le VHB, et la vaccination reste le meilleur moyen de prévention contre cette infection.

En effet, le vaccin contre le VHB est efficace à 95 % pour éviter l'apparition de l'hépatite chronique B, c'est le premier vaccin permettant de prévenir la survenue d'un cancer, et il est aujourd'hui l'un des vaccins les plus largement utilisés dans le monde (OMS 2003).

Ce vaccin est maintenant inclus dans les programmes nationaux de vaccination dans la majorité des pays. Sa généralisation à l'échelle mondiale devrait aboutir à un intervalle de temps approprié à la disparition de l'infection par le VHB et par conséquent à la disparition du carcinome hépatocellulaire induit par ce virus (Chang et al 2009).

Donc, l'introduction en 1999 de la vaccination contre l'hépatite B dans le calendrier national de vaccination, pourra résoudre dans l'avenir le problème de l'infection à VHB au Maroc (Chakravarty et al 2005, André 2000).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abedi F, Madani H, Asadi A et al. Significance of blood-related high-risk behaviours and horizontal transmission of hepatitis B Virus in Iran. Arch Virol 2011; 156:629–635.

Agbenu E, Banla A, Kolou M et al. Marqueurs sérologiques utilisés dans la surveillance de l'infection par le virus de l'hépatite B au Togo : état des lieux et propositions. Med Trop 2008; 68 : 621-624.

Ajana F. Les variants du virus de l'hépatite B virale. Journal de pédiatrie et de puériculture 2006 ; 19:52-55.

Ajana F. L'hépatite virale B, encore et toujours d'actualité. Archives de pédiatrie. 2006 ; 13 :1269–1274.

Alam MM, Zaidi SZ, Malik SA et al. Molecular epidemiology of Hepatitis B virus genotypes in Pakistan. BMC Infectious Diseases 2007 ; 7:115.

Alavian SM. Elevated Prevalence of Hepatitis B in Mexican Hemodialysis Patients. A Multicentric Survey. Archives of Medical Research 2010 ; 41 : 576

Almeida R.P.A, Cardoso D.D.DOP. Detection of HBV DNA by nested-PCR in a HBsAg and anti-HBc negative blood bank donor. J Clin Virol 2006; 36, 231-234.

Alter HJ, Blumberg BS. Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia antigen) Blood 1966; 27: 297–309.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. J Hepatol 2003; 39: S64–69.

Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. J Hepatol 2006; 44,6-9.

Amri I, Hmaied F, Loisy F et al. Détection du virus de l'hépatite A dans les coquillages en Tunisie par reverse transcription-nested PCR – recherche de corrélation entre la contamination virale et bactérienne. Pathologie Biologie 2011 ; 59 :217-221

André F. Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa. *Vaccine* 2000; 18, 20-22.

Antona D. L'hépatite B aiguë en France : aspects épidémiologiques. *Hépatogastro* 2006 ; 1 : 51-61.

Arboleda M, Castilho M.C, Fonseca J.C.F et al. Epidemiological aspects of hepatitis B and D virus infection in the northern region of Amazonas, Brazil. *T Roy Soc Trop Med H* 1995; 89, 481-483.

Asselah T, Lada O, Boyer N et al. Traitement de l'hépatite chronique B. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2008 ; 32 : 749-768.

Atitar I, Achour J, Amrani L et al. Prevalence of hepatitis B and C markers in high risk hospitalized patients in Morocco. *Viral hepatitis / Arab Journal of Gastroenterology* 2009; 10: 61–71

Ayari R, Gorgi Y, Aouadi H, Ayed-Jendoubi S, Ayed K. La PCR dans la détection de l'ADN du virus de l'hépatite B : choix des amorces. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2006 ; 21 : 308–313.

Ayed K, Gorgi Y, Ayed-jendoubi s et al. Hepatitis B virus genotypes and precore/core-promoter mutations in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Infection* **2007; 54:291-297.**

Barkat A, Braikat M, Lamdouar Bouazzaoui N. Calendrier National de Vaccination : évolution et perspectives. Centre National de Référence en Néonatalogie et en Nutrition - Hôpital d'Enfants de Rabat, Maroc. 2008.

Barraud H, Bronowicki JP, Mougénel JL et al. Vaccination contre l'hépatite B en France. *Hépatogastro* 2000 ; 7 : 271-278.

Bartenschlager R, Sparacio S. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Research* 2007; 127:195–207.

Bekondi C, Olinger C M, Boua N et al. Caractérisation des souches de virus de l'hépatite B circulant en République centrafricaine : résultats préliminaires. *Pathologie Biologie* 2008 ; 56 : 310–313.

Ben-Alaya-Bouafif N, Bahri O, Chlif S et al. Heterogeneity of hepatitis B transmission in Tunisia: Risk factors for infection and chronic carriage before the introduction of a universal vaccine program. *Vaccine* 28 ; 2010 : 3301–3307.

Ben Amora I, Rekika T, Hentatia N et al. Facteurs influençant la prévalence de l'antigène HB chez des donneurs de sang tunisiens. Étude à propos de 275 300 donneurs de sang. *Transfus Clin Biol* 2009 ; 16, 283-349.

Bennani A. Epidémiologie Moléculaire de l'hépatite C au Maroc. Thèse de Doctorat Es.Sciences ; Université Sidi Med Ben Abdellah Fès.2002.

Ben Slama N, Si Ahmed SN, Zoulim F. Quantification de l'antigène HBs : signification virologique. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2010 ; 34 : 112-118.

Blumberg B.S et al. A Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrome Leukemia and Hepatitis. *Annals of Internal Medicine*. 1967 ; 924-931.

Boulaajaj K, Younes Elomari Y, Elmaliki B et al. Infections virales : VHC, VHB et VIH chez les hémodialyses, CHU Ibn-Rochd, Casablanca. *Néphrologie & Thérapeutique* 2005 ; 1 : 274–284,

Bourlière M. Portage inactif du virus de l'hépatite B. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; 29: 369-373.

Bourlière M, Castellani P. Traitement de l'hépatite chronique B: nouvelles perspectives. *Gastroentérologie clinique et biologique* 2008 ; 32 : 64-69.

Boulos D, Goedhuis NJ, Wu J et al. Enhanced surveillance for acute and likely acute hepatitis B in Canada : 1999 à 2002. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005;16:275-281.

Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 1059-1063.

Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. World J Gastroenterol 2007; 13: 65-73.

Buffet C. Hépatite chronique virale B. Revue Française des Laboratoires 2003 ; 358 : 31-37.

Buffet C. Hépatite virale B. Arch Mal Prof Env 2005 ; 66 : 254-262.

Buisson Y, Coursaget R, Van Cuyck-Gandre H. Le diagnostic des hépatites virales transmises par voie féco-orale. Méd Mal Infect 1994 ; 24: 604-609.

Busch M.P. Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors? Transfus Clin Biol 2004; 11, 26-32.

Campos R.H, Mbayed V.A., Pineiro Y.L.F.G..Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. Journal of Clinical Virology 2005; 34: 8-13.

Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology 2009 ; 51 : 798–809.

Castolo MC, ndez-ruiz LH, Ibarra-robles IE et al. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection And Related Risk Factors In A Rural community of Mexico. Am J Trop Med Hyg 2001; 65:759-763.

Chakravarty R, Chowdhury A, Chaudhuri S, Santra A, Neogi M, Rajendran K et al.. Hepatitis B infection in Eastern Indian families: Need for screening of adult siblings and mothers of adult index cases. Public Health 2005; 119, 647-654.

Chams V, Fournier-Wirth C, Chabanel A, Hervé P, Trépo C. Le virus GB-C ou virus « dit » de l'hépatite G est-il impliqué en pathologie humaine ? Transfusion Clinique et Biologique 2003 ; 10: 292–306.

Chan H.L.Y et al. Hepatitis B virus Genotype C is associated with more severe liver Fibrosis than genotype B. Clinical gastroenterology and hepatology 2009; 7: 1361-1366.

Chang MH, You SL, Chen CJ et al. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:1348–1355.

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

Cristina J, Costa-Mattioli M. Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus. *Virus Research* 2007 ; 127: 151–157.

Degos F. Vaccination contre l'hépatite B. *Presse Med* 2006; 35: 347-352.

Denis François. Les virus transmissibles de la mère à l'enfant. Edition John Libbey Eurotexte. 1999; 461.

Denis A. L'hépatite B aiguë en France : aspects épidémiologiques. *Hépatogastro* 2006 ; 13 : 51-61.

Deny P, Nicolas J-C, Poinso H, Marechal V. virus de l'hépatite D : un modèle original de réplication virale. *Revue française des laboratoires* 1996; 283: 78-84.

Dény P, Zoulim F. Hepatitis B virus: From diagnosis to treatment. *Pathologie Biologie* 2010 ; 58 : 245–253.

De Oliveira P.R, Yamamoto A.Y, de Souza C.B.S, de Araújo N.M, de Andrade Gomes S, Heck A.R et al. Hepatitis B viral markers in banked human milk before and after Holder pasteurization. *J Clin Virol* 2009; 45, 281–284.

Desbois D, Couturier E, Graube A et al. Diversité génétique d'un génotype rare du virus de l'hépatite A. *Pathologie Biologie* 2011 ; 59 : 57–65.

Desiré N, Sanchis T, Ben Moussa F et al. Co-infection par le VHB de génotype G : développement, validation et application d'une technique de quantification spécifique du VHB de génotype G. *Pathologie Biologie* 2011 ; 59 : 13–19.

Ding X, Mizokami M, yao G et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001; 44: 43-47.

Djeriri K. ; LAURICHESSE H. ; MERLE J et al. Occupational medicine (Oxford) Y. 2008 ; 6: 419-424.

Dodd RY, Notari 4th EP, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. Transfusion 2002;42 : 975–979.

Dubois F, Goudeau A. Le virus de l'hépatite delta, Diagnostic sérologique. Immunoanal Biol Spéc 1990 ; 21: 47-51.

Dubois F, Roingeard P. Biologie du virus de l'hépatite B. Médecine thérapeutique 1998 ; 1 : 5-12.

Ducancelle A, Pivert A, Lunel-Fabiani F. Les mutants précore et du promoteur basal du core du virus de l'hépatite B. Virologie 2011; 15: 100-114.

Ducancelle A, Servant-Delmas A, Beuvelet T et all. Résultats de trois méthodes pour la détection de la mutation précore G1896A du virus de l'hépatite B chez les donneurs de sang français : PCR temps réel, séquençage et test Inno-LIPA. Pathologie Biologie 2011; 59: 21–27.

Dumpis U, Charles Holmes E, Mendy M, Hill A, Thursz M, Hall A et al. Transmission of hepatitis B virus infection in Gambian families revealed by phylogenetic analysis. J Hepatol 2001; 35, 99-104.

ÉMILE C. Actualités sur le VHB. OptionBio 2009 ; 414 : 16-17.

ÉMILE C. Le point sur l'hépatite B. OptionBio. 2008 ; 402 : 10-12.

Émile C Les variants du virus de l'hépatite B. OptionBio 2009; 415: 20-21.

Eun Young C, Chang Soo C, Ji-Hyun and all. Association between Hepatitis B Virus X Gene Mutations and Clinical Status in Patients with Chronic Hepatitis B Infection. Gut and Liver 2011 ; 5 : 70-76.

Ezzikouri S, Chemin I, Chafik A et al. Genotype determination in Moroccan hepatitis B chronic carriers. Infection, Genetics and Evolution 2008; 8: 306–312.

Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *Journal of Hepatology* 2008; 48: 335-352.

FLASH INFO. Hépatite B : mieux la connaître pour mieux la traiter. *Journal de pédiatrie et de puériculture* 2006 ;19 : 340–343.

François G, Kew M, Van Damme P, Mphahlele MJ, Meheus A. Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? *Vaccine* 2001; 19: 3799–3815.

Froio N, Nicastrì E, Comandini UV et al. Contamination by Hepatitis B and C Viruses in the Dialysis Setting. *American Journal of Kidney Diseases* 2003 ; 42 : 546-550.

Fournier C, Zoulim F. Associations thérapeutiques dans la prise en charge des hépatites chroniques B. *Gastroentérologie clinique et biologique* 2008 ; 32 : 42-49.

Gallina A, Bonelli F, Zentilin L, Rindi G, Muttini M, Milanesi G. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine- like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J Virol* 1989; 63: 4645-4652.

Gaudelus J. Mobiliser les parents pour la vaccination de leurs enfants contre l'hépatite B: le rôle du pédiatre. *Archives de Pédiatrie* 2010; 17: 6-13.

Gaudy C, Goudeau A. La diversité du virus de l'hépatite C : méthodes d'étude, implication dans la pathogénèse et la résistance au traitement. *Virologie* 2005 ; 9 : 343-355.

Gerlich WH, Lu X, Heermann KH. Studies on the Attachment and Penetration of Hepatitis-B Virus. *JHepatol* 1993 ; 17: 10-14.

Hadler, S.C., & Margolis, H.S. Epidemiology of hepatitis B virus infection. *Hepatitis B vaccines in clinical practice* New York: Marcel Dekker Inc 1993: 141-157.

Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:617-624.

Halfon P, Pol S, Bourlière M, Cacoub P. Les génotypes du virus de l'hépatite B Implications cliniques, épidémiologiques et thérapeutiques. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2002 ; 26 : 1005-1012.

Halfon P, Pol S, Bourlière M, Courcambeck, Cacoub P. Nucléoside analogues resistance in treatment of chronic hepatitis B virus infection. *La revue de médecine interne* 2003, 24:786-793.

Handra-Luca A, Tengher L, Zioli M. Aspects Histopathologiques des Infections à Virus Hépatotropes. *Revue Francophone des Laboratoires* 2007 ; 388 : 41-48.

Hannachi N, Hidar S, Harrabi I et al. Séroprévalence et facteurs de risque de l'hépatite virale E chez la femme enceinte dans le centre tunisien. *Pathologie Biologie* 2009 ; doi:10.1016/j.patbio.2009.06.004.

Hanslik T, Valleron A-J, Flahault A. Évaluer le rapport bénéfices/risques de la vaccination contre l'hépatite B en France en 2006. *La revue de médecine interne* 2006 ; 27 : 40–45.

Hart, G. Factors associated with hepatitis B infection. *International Journal of STD and AIDS* 1993; 4: 102-106.

Hauri AM, Armstrong GL, Hutin YJ. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *Int J STD AIDS* 2004;15:7—16.

Hersh, T., Melnick, J.L., Goyal, R.K. et al. Nonparenteral transmission of viral hepatitis type B (Australia antigen-associated serum hepatitis). *New England Journal of Medicine* 1971; 285: 1363-1364.

Hillaire S. Infection occulte par le virus de l'hépatite B. *Hépatogastro* 2006 ; 13 : 87-90.

Hilmer J K, Zlotnick A and Bothner B. Conformational Equilibria and Rates of Localized Motion within Hepatitis B Virus Capsids. *J. Mol. Biol.* 2008; 375: 581–594.

Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *International Journal of Medical Sciences* 2005 ; 2 : 50-57.

Hui AY, Hung LCT, Tse PCH. Transmission of hepatitis B by human bite—Confirmation by detection of virus in saliva and full genome sequencing. *Journal of Clinical Virology* 2005; 33: 254–256.

Huraux J M. Virologie. Faculté de médecine Pierre et marie curie, Université Paris-VI. DCEM1 : 2006-2007.

Hutin YJF, Hauri AM, Armstrong GL. Use of injections in healthcare settings worldwide, 2000: literature review and regional estimates. *BMJ*. 2003;327:1075–1079

Izopet J. Tropisme du virus de l'hépatite E. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010 ; 423 : 69-73.

Jafari S, Buxton JA, Afshar K. Tattooing and Risk of Hepatitis B: A Systematic Review and Meta-analysis. *Revue canadienne de santé publique* 2012; 103: 207-2012.

Kahloun A, Bourlière M, Zoulim Z. Bithérapie par analogues dans le traitement de l'hépatite chronique B : de novo ou en cas d'échec *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2010 ; 34 : 126-135.

Kammerlander R, Zimmermann H. Transmission de l' hépatite B. *Sozial- und Präventivmedizin* 1998 ; 43 : 105-107.

Kao J.H, Chen D.S. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2, 395-403.

Kao J.H et al. Hepatitis B genotype Correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *gastroenterology* 2000; 118: 554-559.

Keller E et Cribier B. Interactions entre les virus des hépatites et les cellules hôtes. *Médecine et Maladies Infectieuses* 1995 ; 25: 1051-1055.

Kent GB, Brondum J, Keenlyside RA, LaFazia LM, Scott HD. A large outbreak of acupuncture-associated hepatitis B. *Am J Epidemiol* 1988; 127:591-8.

Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathologie Biologie* 2010 ; 58 : 273-277.

Khaled, I.A., Mahmoud, O.M., Saleh, A.F., Bioumie, E.E. Prevalence of HBV genotypes among Egyptian hepatitis patients. *Mol. Biol. Rep.* 2011; 38: 4353–4357.

Khan A, Tanaka Y, Saito H, Ebinuma H et al. Transmission of hepatitis B virus (HBV) genotypes among Japanese immigrants and natives in Bolivia. *Virus Research* 2008; 132: 174-180.

Khan F, Shams s, Qureshi I D et al. Hepatitis B virus infection among different sex and age groups in Pakistani Punjab. *Virology Journal* 2011 ; 8:1-5.

Khuroo M S. Viral hepatitis in international travellers: risks and prevention. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003 ; 21 : 143-152.

Kidd-Ljunggren K, Holmberg A, Bläckberg J, Lindqvist B. High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers. *J Hosp Infect* 2006; 64, 352-357.

Kim JH, Sohn SY, Benedict Yen ST, Ahn BY. Ubiquitin-dependent and -independent proteasomal degradation of hepatitis B virus X protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 366:1036–1042.

Kim YS, Ahn YO. Factors associated with intrafamilial transmission of hepatitis B virus infection in Korea. *J Korean Med Sci.* 1993 December; 8(6): 395–404.

Kitab B, Essaid El Feydi A, Afifi R et al. Hepatitis B genotypes/subgenotypes and MHR variants among Moroccan chronic carriers. *Journal of Infection* 2011 ; 63 : 66-75.

Kondili LA, Brunetto MR, Maina AM et al. Clinical and molecular characterization of chronic hepatitis B in Albania: a country that is still highly endemic for HBV infection. *J Med Virol* 2005;75:20–26.

Kramvis A, Kew M, Guido F. Hepatitis B Virus genotypes. *Vaccine* 2005; 23: 2409-2423.

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

Lamoril J, Bogard M, Deybach JC et al. *Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007. Les applications et leur avenir – Partie 2. Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2007 ; 22 : 73–94.

Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004; 11:97–107.

Lebarbier C, Williams V, Garandeau C et al. Détection de l'ADN du VHB par des techniques sensibles et définition de l'infection VHB chronique à mutants pré-C-C. *Pathologie Biologie* 2004 ; 52 : 501–504.

Le Duff Y, Blanchet M, Sureau C. The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *J Virol*. 2009 ; 83 : 12443–12451.

Leggat P A, Zwar N A, Hudson B J. Hepatitis B risks and immunisation coverage amongst Australians travelling to Southeast Asia and East Asia. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2009 ; 7: 344-349.

Li J-S, Tong S-P, Wen Y-M et al. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J. Virol*. 1993; 67: 5402-5410.

Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009; 373 : 582-592.

Liu C.J, Chen D.S, Chen P.J. Epidemiology of HBV infection in Asian blood donors: Emphasis on occult HBV infection and the role of NAT. *J Clin Virol* 2006; 36, 33-44.

Lieven S, De Gendt S, Van Geyt C et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* 2000; 81:67-74.

Limentani AE, Elliott LM. An outbreak of hepatitis B from tattooing. *Lancet* 1979; 2:86-88.

Lin CL, Kao JH, Chen BF et al. Application of hepatitis B virus genotyping and phylogenetic analysis in intrafamilial transmission of hepatitis B virus. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1576-1581

Lin CL, Kao JH. Intrafamilial transmission of hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:765–766.

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

Linda B, Pujol FH, Swenson PD et al. Antigenic Diversity of Hepatitis B Virus Strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *Journal of clinical microbiology* 1998; 36: 648-651.

Livingston S et al. Clearance of hepatitis B e Antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D and F. *Gastroenterology* 2007; 133: 1452-1457.

Lobato C, Tavares-Neto J, Rios-Leite M et al. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:863—868.

Maaref F, Kilani B, Ammari Let al . Prévalence de l'hépatite G et des hépatites virales B et C dans la population VIH (+) de l'hôpital La Rabta, Tunis, Tunisie. *Pathologie Biologie Pathol Biol* 2009 ; doi:10.1016/j.patbio.2009.10.002.

Mahoney F.J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999 ;12: 351-366.

Marcellin P, Asselah T, Lada O. Traitement « à la carte » de l'hépatite chronique B. *Gastroentérologie clinique et biologique* 2008 ; 32 : 1–6.

Mast E.E, Alter M.J, Margolis H.S. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine* 1999; 17, 1730-1733.

Mast E, Weinbaum CM, et al. 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 II: immunization of adults. MMWR Recomm Rep 2006 ; 55: 1-33.

Mayerat c, Mantegani A, Ferei P.C. Does hepatitis B virus genotype influence the clinical outcome of HBV infection? J Viral Hepat 1999; 6: 299-304.

McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. Hepatol Int 2009; 3:334-342.

Medici M.C, Aloisi A, Martinelli M et al. HBV genotypes and antiviral-resistant variants in HBV infected subjects in Northern Italy. The New Microbiologica 2006 : 29 ; 63-67.

Meheus A. Teenagers' lifestyle and the risk of exposure to hepatitis B virus. Vaccine 2000; 18, 26-29.

Messageot F, Salhi S, Lainé S, Rossign J M. L'antigène e du virus de l'hépatite B (HBe) : une protéine encore énigmatique. Virologie 2001 ; 5 : 183-193.

Michel ML, Tiollais P. Hepatitis B vaccines: Protective efficacy and therapeutic potential. Pathologie Biologie 2010 ; 58 : 288–295.

Michault A, Faulques B, Sevadjan B et al. Prévalence des marqueurs des virus des hépatites A, B, C à La Réunion (Hôpital sud et prison de Saint Pierre. Bull Soc Pathol Exot, 2000 ; 93 : 34-40.

MICROLAB. HPV Genotyping by INNO-LiPA. Microgen Bioproducts Newsletter. 2005 : No 19.

Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. Intervirology 2003;46(6):329–38.

Mouterde O, Marie Cardine A, Dubuisson S et al. Transmission horizontale de l'hépatite b. a propos d'une famille de 17 enfants. Archives de Pédiatrie 1999 ; 2 : S557-S

Mrani S, Sakhsokh Y, Gille Y et al. Epidémiologie de l'infection par les hépatites virales B et C. *Cah Med* 2002;4:87-88.

Muszlak M, Lartigau-Roussin C, Farthouat L et al. Vaccination de l'enfant contre l'hépatite B à Mayotte, île française des Comores. *Archives de pédiatrie* 2007 ; 14 : 1132–1136.

Nicand E, Bigaillon C, Tessé S. Hépatite E : maladie émergente ? *Pathologie Biologie* 2009 ; 57: 203–211.

Niederhausera C, Mansouri Taleghania B, Graziania M. Blood donor screening: how to decrease the risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus?. *SWISS MeD Wkly* 2008;138: 134–141.

Norder H, Courouce AM, Coursaget P et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004;47:289-309.

Odusanya O.O, Meurice F.P, Hoet B. Nigerian medical students are at risk for hepatitis B infection. *T Roy Soc Trop Med H* 2007; 101, 465-468.

Organisation mondiale de la Santé Genève. Introduction du vaccin contre l'hépatite B dans les services de vaccination infantile. www.who.int/vaccines-documents. 2001.

Orito E, Ichida T, sakugawa h et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic hepatitis B virus infection in japan; *hepatology* 2001; 34: 590-594.

Osiowy C, Giles E. Evaluation of the INNO-LiPA HBV Genotyping Assay for Determination of Hepatitis B Virus Genotype. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 ; 41 : 5473–5477.

Ozaslan M, Ozaslan E, Barsgan A et al. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Turkish patients. *Journal of Genetics* 2007; 86: 195–201.

Patient R. Hourieux C. Roingeard P. Morphogenèse du virus de l'hépatite B. *Virologie* 2008 ; 12: 453-464.

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

Petzold DR, Tautz B, Wolf F et al. Infection chains and evolution rates of hepatitis B virus in cardiac transplant recipients infected nosocomially. *J Med Virol* 1999 ; 58 : 1-10.

Pillonel J, Laperche S. Risque résiduel de transmission du VIH, du VHC et du VHB par transfusion sanguine entre 1992 et 2002 en France et impact du dépistage génomique viral. Transfusion Clinique et Biologique 2004 ; 11 :81–86.

Pineau P, Tiollais P. La vaccination : atout majeur dans la lutte contre le cancer du foie induit par le virus de l'hépatite B. Pathologie Biologie 2010 ; 58 :444–453.

Pol S. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B. Presse Med 2006; 35: 308-316.

Pol S. Vaccin contre le virus de l'hépatite B et neuropathie démyélinisante : polémique et désinformation. Presse Med 2009; 38: 519–523.

Pol S, Sogni P. Traitement de l'hépatite chronique B : observance et tolérance. Gastroentérologie Clinique et Biologique 2010 ; 34 :142-148.

Pujol FH, Navas MC, Hainaut P et al. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. Cancer Letters 2009 ; 286 : 80–88.

Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* 1990; 64: 613-620.

Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y et al. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol* 2012; 84: 587-595.

Raimondi S, Maisonneuve P, Bruno S et al. Is response to antiviral treatment influenced by hepatitis B virus genotype? *J Hepatol* 2010; 52:441-449.

Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2007; 46: 160–170.

Ramezani A, Gachkar L, Eslamifar A et al. Detection of hepatitis G virus envelope protein E2 antibody in blood donors. *International Journal of Infectious Diseases* 2008 ;12 : 57—61.

Ranger-Rogez S, Alain S, Denis F. Virus des hépatites : transmission mère-enfant. *Pathologie Biologie* 2002 ; 50 : 568–575.

Ratziu V, Sayegh-Tainturier M.H, Nourani M et al. Mutants pré-C du VHB. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2002 ; 26 : 509-513.

Read J S, Cannon M J, Stanberry L R et al. Prevention of Mother-to-Child Transmission of Viral Infections. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2008 ; 38 : 274-297.

Redd JT, Baumbach J, Kohn W et al. Patient-to-patient transmission of hepatitis B virus associated with oral surgery. *J Infect Dis* 2007; 195: 1311-1314.

Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005 ; 5:215–229.

Rimland D, Parkin WE, Miller GB et al. Hepatitis B outbreak traced to an oral surgeon. *N Engl J Med* 1977 ; 296 : 953-958.

Rizzetto M, Ciancio A. Chronic HBV-related liver disease. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 72-84.

Rodriguez-Frias F, Jardi R, Buti M et al. Hepatitis B virus genotypes and G1896A precore mutation in 486 Spanish patients with acute and chronic HBV infection. *J Viral Hepat* 2006;13:343–50.

Roggendorf M, Viazov S. Health care workers and hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39, 89-92.

Roingeard P. La charge virale dans l'infection par le virus de l'hépatite B. *Virologie* 1997 ;1 : 55-61.

Romanò L, Paladini S, Tagliacarne C et al. The changing face of the epidemiology of type A, B, and D viral hepatitis in Italy, following the implementation of vaccination. *Vaccine* 2009; 27, 3439–3442.

Roque-Afonso AM, Ferey M.P, Belkhiri D et al. Les mutants de l'Ag HBs: prévalence, impact diagnostique et clinique. *Pathologie Biologie* 2005; 53 : 563-568.

Rosmorduc O, Paterlini P, Poupon R et al. Virus des hépatites et carcinome hépatocellulaire. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 1999; 23: 363-375.

Ross RS, Viazov S, Roggendorf M. Provider-to-patient transmission of hepatitis B virus. *Lancet* 1999 ; 353 : 324-5.

Roumeliotou-Karayannis A, Papaevangelou G, Tassopoulos N et al. Post-exposure active immunoprophylaxis of spouses of acute viral hepatitis B patients. *Vaccine* 1985 ; 3: 31-34.

Salvadori M, Rosso G, Carta P et al. Donors Positive for Hepatitis B Core Antibodies in Nonliver Transplantations. *Transplantation Proceedings* 2011; 43: 277–279.

Sbai A, Bennani A, Benjouad A, Hassar. HBV genotypes in Morocco. *J Clin Virol* 2007; 38:184–185.

Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology* 2007 ; 13: 14-21.

Schramm F, Moenne-Loccoz R, Fafi-Kremer S, et al. Étude du leucotropisme du virus de l'hépatite C par analyse des quasi-espèces virales dans le contexte de la transplantation hépatique. *Pathologie Biologie* 2008 ; 56 : 487–491.

Seitz S, Urban S, Antoni C et al. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J* 2007; 26: 4160-4167.

Shepard CW, Simard DP, Finelli L et al. Hepatitis B virus infection: eidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 2006; 28: 112–25.

Siegel D, Alter M.J, Morse S. Hepatitis B Virus Infection in High-Risk Inner-City Neighborhoods in San Francisco. *Hepatology* 1995; 22 : 44-49.

Sifer C, Cassuto G, Poncelet C et al. Risques de l'assistance médicale à la procréation en cas d'infection par le VIH, les virus des hépatites C ou B. Qu'apporte la loi française par l'arrêté de 2001 ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 2003 ; 31 : 410–421.

Simonsen L, Kane A, Lloyd J, Zaffran M et al. Unsafe injections in the developing world and transmission of bloodborne pathogens: a review. *Bull World Health Organ.* 1999; 77: 789–800.

Stuyver LJ, Locamini SA, Lok A, et al : Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001; 33 : 751-757.

Sulkowski M.S. Viral hepatitis and HIV coinfection. *J Hepatol* 2008; 48: 353–367.

Thakur V, Guptan RC, Kazim SN et al. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:165-170.

Thibault V. Infections nosocomiales dues au virus de l'hépatite B. *Anales de Biologie clinique* 2001 ; 59 : 12-18.

Thiers V, Tuveri R, Brechot C, Epidémiologie moléculaire du virus de l'hépatite C. *Revue Française des Laboratoires*, 2000; 320: 41-48.

Thiolet JM. Analyse du risque infectieux lié à la non stérilisation entre chaque patient des porte-instruments rotatifs en chirurgie dentaire. Rapport de l'Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice. 15 mai 2009.

Tamalet C, Colson R, Henry M et al. Molecular characterization of HBV genotypes newly diagnosed in 2004 in southern France. *Journal of Clinical Virology* 2006; 36: S99.

Thakur V, Guptan R.C, Kazim S.N et al. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the indian subcontinent. J. Gastroentérol. Hepatol. 2002; 17: 165-170.

Toan NL, Song le H, Kremsner PG et al. Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam. Hepatology 2006; 43:1375-1384.

Tong S, Li J, Vivitski L, Trépo C. Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an inactive pre-C region Virology 1990; 176: 596-603.

Touré-Fall A.O, Dièye T.N.D, Sall A et al. Risque résiduel de transmission du VIH et du VHB par transfusion sanguine entre 2003 et 2005 au Centre national de transfusion sanguine de Dakar (Sénégal). Transfusion Clinique et Biologique 2009 ;16 : 439–443.

Trépo C, Zoulim F. Traitement de l'hépatite B : progrès attendus. Gastroentérologie Clinique et Biologique 2009 ; 33 : 811-817.

Van der Eijk A, Niesters H.G.M, Götz H.M et al. Paired measurements of quantitative hepatitis B virus DNA in saliva and serum of chronic hepatitis B patients: implications for saliva as infectious agent. J Clin Virol 2004; 29 : 92-94.

Vickers J, Painter MJ, Heptonstall J et al. Hepatitis B outbreak in a drug trials unit: investigation and recommendations. Commun Dis Rep CDR Rev 1994 ; 4 : 1-5.

Vochelle V, Trepo C, Merle P. Traitement des hépatites virales chroniques. Réanimation 2007 ; 16 : 618-625.

Wagner A, Denis F, Ranger-Rogez et all. Génotype du virus de l'hépatite B. Immuno-analyse et Biologie spécialisée 2004 ; 19 : 330-342.

Wang J, Lee AS, Ou JH. Proteolytic conversion of hepatitis B virus e antigen precursor to end product occurs in a postendoplasmic reticulum compartment. J Virol 1991; 65: 5080-5083.

Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathologie Biologie* 2010 ; 58: 267–272.

Werle B, Zoulim F. Nouveaux traitements de l'hépatite B et techniques d'étude de la résistance virale. *Immunoanal Biol spec*. 2001; 16: 158-168.

World Health Organization. Hepatitis B vaccines. WHO website; 2003, <http://www.who.int/vaccines/en/hepatitisb.shtml>.

Wu P C, Margaret B. Comfort M B et al. Epidemiological Study of Hepatitis B Virus Infection in a Dental Outpatient Population. *Journal of the Hong Kong Medical Association*. 1989; 41: 351-354.

Yang J, Luo Q, Zhang C et al. Study on HBV Vertical Transmission via the in vitro Fertilization (IVF) Technique. *J Reprod Contracept*. 2009; 20: 73-79.

Zanetti A., Mariano A. Vaccin anti-hépatite B : le rappel à 10 ans n'est pas nécessaire. *The Lancet* 2005 ; 366 : 1379-1384.

Zarski JP. Épidémiologie de l'hépatite chronique B. *Presse Med*. 2006; 35: 304-307.

Zarski JP, Leroy V. Le patient atteint d'hépatite chronique B non contrôlé. *Gastroentérologie clinique et biologique* 2008; 32: 7–11.

Zarski JP. Influence du traitement sur l'évolution à long terme de l'hépatite chronique B. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2010; 34: 109-111.

Zervou EK, Gatselis NK, Xanthi E et al. Intrafamilial spread of hepatitis B virus infection in Greece. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:911—915.

Zoulim F, JL Gaudin JL, Trepo C. Structure des virus de l'hépatite B et delta. *Immunoanal Biol Spec* 1991; 26: 11-16.

Zoulim F, Seeger C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol* 1994; 68: 6-13.

Zoulim F. Les mutations du Virus de l'hépatite B. 4^{ème} journée annuelle du Gemhep-Paris. 20-janvier-2000.

Zoulim F. Nouveaux tests virologiques et leurs applications dans la prise en charge de l'hépatite B chronique. Presse Med. 2006; 35: 317-326.

Zoulim F, Hépatites Virales B Et C Editeur : John Libbey Eurotext. Collection : Pathologie Science Formation Parution : 30/11/2006 ; Nombre de pages : 246.

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

Zoulim F, Lucifora J, Arzberger S et al. Hepatitis B virus X protein is required for productive infection of human hepatocytes. Journal of Hepatology 2010; 52: 43–54.