

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de BLIDA 1



Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie.

Département de Biologie Et Physiologie Cellulaire.

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de
Master.

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire.
Sous le sujet de recherche :

**Dépistage des antigènes de surface (AgHBs) du virus d'hépatite
B (VHB) par la technique d'ELISA.**

Présenté par :

Mr : KERKAR Fateh

Soutenu le: 24/06/2018

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mme BENAZOUZ F	MAA – BPC. FSNV. USDB1
Examinatrice :	Dr. MATAOUI. H	MCB - BPC. FSNV. USDB1
Promotrice :	Dr. ABDUL HUSSAIN. A.S	MCB – BPC. FSNV. USDB1

Laboratoire privé d'analyses médicales de Larbaa, wilaya de Blida.

Promotion 2018

Remerciements

Je commence tout d'abord par rendre grâce à ALLAH qui nous a donné la santé, la force et les moyens nécessaires pour mener à terme ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à :

Mes chers parents ;

Mme la Chef du Département du BPC et Chef d'Option BCM, Mme SAADI. L ;

Ma promotrice Mme ABDUL HUSSAIN A.S, pour sa patience et ses précieux conseils ;

Mme BENAZOUZ. F ;

Mme MATAOUI. H, de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce modeste travail.

Merci à vous toutes,

Fateh

Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents, à mes frères et ma sœur, à toute la famille et à tous mes amis.

Résumé

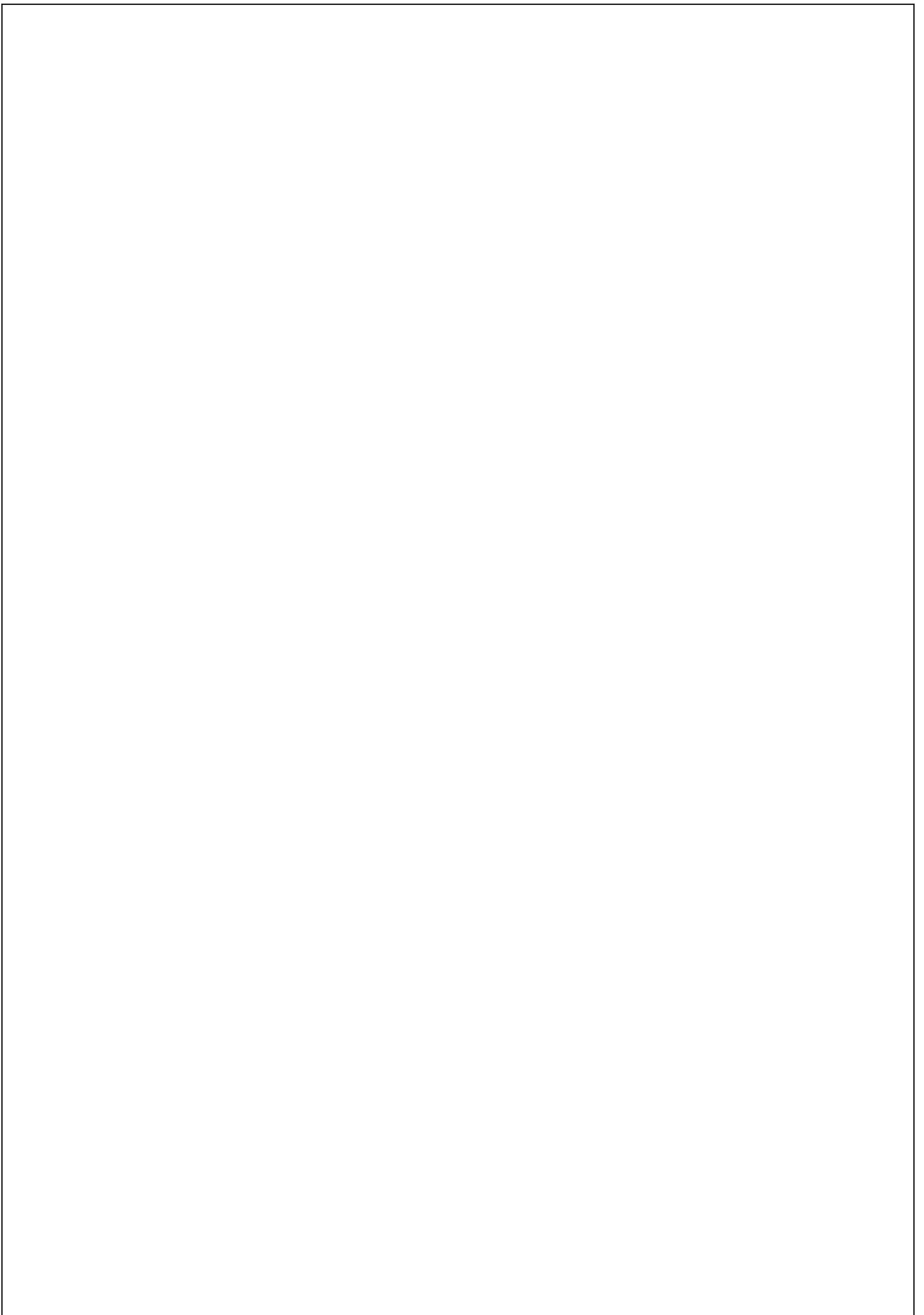
Le virus de l'hépatite B (VHB) cause des infections du foie chez les humains et certains animaux à la famille des *Hepadnaviridae* et au genre *Orthohepadnavirus* (Orthohepadnavirus), dont le génome est constitué d'ADN double brin, qui possèdent une activité de rétro-transcription et est contenu dans une nucléocapside isocaédrique de 22-25 nm de diamètre enveloppée par une bicouche lipidique associée à des protéines de surface, cette enveloppe porte notamment l'antigène de surface HBs, ou protéine HBsAg. 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) kit Monolisa™ HBs Ag ULTRA, pour cela nous avons dépisté 219 patients (88 hommes et 131 femmes) au niveau de laboratoire privé d'analyses médicales de Larbaa wilaya de Blida. Nous avons trouvé au début 45 sérum positifs, après test de confirmation par le Kit Monolisa™ HBs Ag ULTRA confirmatory Version 3, nous avons trouvé seulement 40 sérums positifs (19 hommes et 21 femmes). Pour la prévalence de l'AgHBs chez les sujets dépistés, nous avons remarqué que les hommes sont beaucoup plus touchés par le VHB (21.6 %) que les Femmes, ainsi nous avons constaté que la tranche d'âge 25-34 ans était la plus touché par le VHB (26.1 %) par rapport les autres tranches étudiées, nous avons remarqué aussi que les mariés et les célibataires sont tous infectés par le virus de l'hépatite B avec un taux de portage respectivement de 20,80 % et 13,33%.

Mots clés : VHB, AgHBs, ELISA, test immunoenzymatique, protéines de surface, dépistage, prévalence

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) causes liver infections in humans and some animals, belongs to the family of Hepadnaviridae and to the genus Orthohepadnavirus (Orthohepadnavirus), whose genome is made up of double-stranded DNA, which possess a retro-transcription activity and is contained in an isocaudric nucleocapsid of 22-25 nm in diameter enveloped by a lipid bilayer associated with surface proteins, this envelope carries HBs surface antigen, or HBsAg protein. Surface antigen (HBsAg) is the most commonly used serological marker for the diagnosis and detection of HBV. In this study, the test used for the research of HBsAg is the Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), Monolisa™ HBs Ag ULTRA kit, for which we screened 219 patients (88 men and 131 women) of private laboratory of medical analyzes of Larbba, wilaya of Blida. We found at first 45 serum positives, after confirmation test by the Monolisa™ HBs Ag ULTRA Kit, we found only 40 positive sera (19 men and 21 women). For the prevalence of HBsAg in screened individuals, we found that men are significantly more affected by HBV (21.6 %) than women, so we found that the 25-34 age groups was the most affected by HBV (26.1 %), compared to the other slices studied, we also noticed that married and single people are all infected with the hepatitis B virus with a carrier rate of 20.80% and 13.33% respectively.

Key words: HBV, HBsAg, ELISA, enzyme immunoassay, surface proteins, screening, prevalence of HBsAg, serological marker.



Sommaire

Introduction	01
---------------------------	-----------

PARTIE 01 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉ SUR LE VIRUS DE L'HÉPATITE B (VHB).

I.1- La découverte du VHB	03
I.2- Définition et classification du VHB	03
I.3- propriétés physico-chimiques	04
I.4- structure du VHB	04
I.4.1- structure du virion	05
I.5- Organisation génétique du VHB	06
I.5.1- Structure de l'ADN	06
I.5.2- Carte génétique du VHB	07
I.6- Cycle de vie du VHB	09
I.7- Réponses immunitaires au cours de l'infection par le VHB	10
I.7.1- Réponse innée	10
I.7.2- Réponse adaptative	10
I.8- Épidémiologie et modes de transmission	11
I.8.1- Prévalence	11
I.8.2- Mode de transmission	12
I.9- Infection par le VHB	12
I.10- Les marqueurs sériques du VHB	15
I.11- Le diagnostic du VHB	16
I.11.1- Diagnostic direct	16
I.11.2- Diagnostic indirect	16
I.11.3- Diagnostic différentiel	17
I.12- Traitement prophylactique ou curatif	17
I.12.1- Prophylaxie	17
I.12.2- Traitement	17

CHAPITRE II : L'IMMUNODOSAGE PAR TEST ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY)

18

II.1- Définition et Principe d'ELISA	19
II.2- ELISA direct (dELISA)	19
II.3- ELISA indirect (iELISA)	19
II.4- ELISA compétitif direct (cdELISA)	19

II.5- ELISA sandwich.....	20
---------------------------	----

PARTIE 02 : ÉTUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATÉRIELS ET METHODES..... 23

I.1- Matériels.....23

a- Matériels biologiques23

b- Matériels non biologique..... 23

I.2- Méthodes..... 24

I.2.1- Population étudiée 24

I.2.2- L'échantillonnage..... 24

a- Réception des échantillons.....24

b- Manipulations des échantillons 25

I.2.3- Dépistage du VHB..... 25

➤ Le but du dépistage..... 25

➤ L'intérêt de l'analyse biologique dans la mise en evidence du VHB clinique.....25

➤ Principe du test monolisa™ HBs Ag ULTRA26

➤ Procédure du dosage 26

➤ Calcul et interprétation des résultats 27

✚ Calcul de la densité optique moyenne du contrôle négatif : DO R327

✚ Calcul de la valeur seuil 28

✚ Interprétation des résultats 28

I.2.4- Test de confirmation.....29

✚ Principe de test 29

✚ Procédure du test..... 30

✚ Calcul / Interprétation des résultats.....30

➤ Ratio de réactivité des contrôles et des échantillons.....30

➤ Pourcentage d'Inhibition.....31

➤ Interprétation des résultats 31

I.2.5- Analyse statistique.....30

Chapitre II : Résultats et discussions.....33

I- Résultats descriptifs.....33

➤ Répartition de la population d'étude en fonction de l'âge..... 33

➤ Répartition de la population d'étude en fonction du sexe 33

➤ Répartition de la population d'étude en fonction de la profession 34

➤ Répartition de la population d'étude en fonction du statut matrimonial.....34

II- Résultats analytiques..... 35

➤ Dépistage de l'Ag HBs35

- Test de confirmation 35
- Prévalence de l'AgHBs en fonction de la tranche d'âge..... 35
- Prévalence de l'AgHBs en fonction du sexe.....35
- Prévalence de la maladie AgHBs en fonction de la profession des patients.....37
- Prévalence de l'Ag HBs selon le statut matrimonial..... 38

Chapitre III : Conclusion 39

Références bibliographiques 40

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS :

Ac anti-HBs: Anticorps anti-HBs

ADNccc: ADN circulaire clos covalent

ADNrc : ADN relaché circulaire

ALAT: alanine aminotransférase

Antigène HBc : antigène du core du virus de l'hépatite B

Antigène HBe : Protéine de « precore »,antigène du VHB.

Antigène HBs : antigène de surface de l'hépatite B

ARNpg: ARN prégénomique

ASAT : Aspartate Aminotransférase

cdELISA : Competitive direct enzyme- linked immunosorbent assay

CHO: Chinese hamster ovary

CMH I: Complexe majeur d'histocompatibilité I

CMH II: Complexe majeur d'histocompatibilité II

CMV : Cytomégalovirus

dELISA : Direct enzyme- linked immunosorbent assay

EIH: enzyme immunoassays

ELISA: The enzyme- linked immunosorbent assay

HAV : Virus de l'hépatite A

HCV : Virus de l'hépatite C

HEV : Virus de l'hépatite E

HRP : horse-radish peroxidase

iELISA : Indirect enzyme-linked immunosorbent assay

IL 10 : Interleukine 10

IL2 : Interleukine 2

INTI : Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

INTI : Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

LT CD4 : lymphocytes T CD4

LT CD4 : lymphocytes T CD8

Lymphocyte NK : Natural Killer

ORF : Cadre ouvertes de lecture.

PAL : Phosphatase alcaline

PCR : polymerase chain reaction

pré-C : région précédant le gène C

RIH: radio immunoassays

TGF β : Facteur de croissance transformant β

TNF α : Facteur de nécrose tumorale α

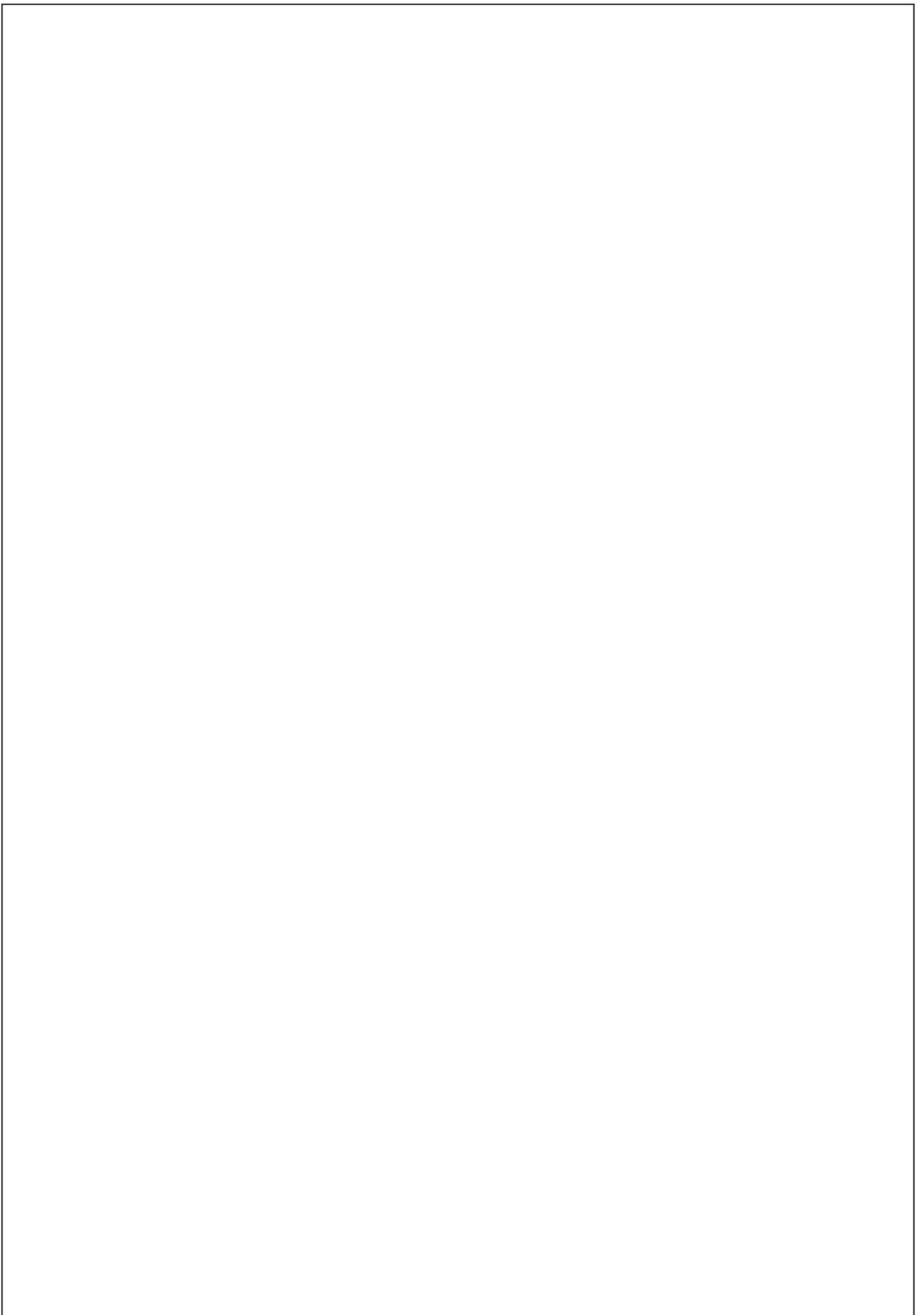
VHB : virus de l'hépatite B

LISTE DES FIGURES :

Figure 01 : Photographie en microscopie électronique des particules virales	05
Figure 02 : Structure du VHB.....	06
Figure 03 : Le génome du VHB et les transcrits viraux	08
Figure 04 : Cycle de réplication du virus de l'hépatite B... ..	09
Figure 05 : Réponse immunitaire cellulaire contre le VHB.....	11
Figure 06 : Prévalence mondiale du VHB et du carcinome hépatocellulaire (CHC)... ..	12
Figure 07 : Évolution de l'infection par le VHB : les quatre phases	15
Figure 08 : Principe du test ELISA	18
Figure 09 : ELISA direct	19
Figure 10 : ELISA indirect.....	19
Figure 11 : cdELISA, dosage d'antigènes.....	20
Figure 12 : cdELISA, dosage d'anticorps.....	20
Figure 13 : Anticorps de capture fixé au fond du puits.....	21
Figure 14 : Puits saturé	21
Figure 15 : Liaison anticorps de capture-antigène.....	21
Figure 16 : Fixation des anticorps de détection.....	21
Figure 17 : Révélation par réaction enzymatique	22
Figure 18 : Répartition de la population d'étude pour l'AgHBs en fonction des classes d'âge ..	33
Figure 19 : Répartition de la population d'étude pour l'AgHBs en fonction du sexe	33
Figure 20 : Répartition des patients atteints d'AgHBs en fonction de la profession.....	34
Figure 21 : Répartition des patients en fonction du statut matrimonial.....	34
Figure 22 : Répartition des patients atteints de l'AgHBs en fonction des classes d'âge.....	36
Figure 23 : prévalence de l'Ag HBs selon le sexe.....	37
Figure 24 : les personnes atteintes d'AgHBs en fonction de la profession.....	37
Figure 25 : Prévalence de l'AgHBs en fonction du statu matrimonial.....	38

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 01 : Modes de transmission du VHB... ..	13
Tableau 02 : Marqueurs sérologiques et virologiques du virus de l'hépatite B... ..	15
Tableau 03 : COMPOSITION DE LA TROUSSE Monolisa™ HBs Ag ULTRA	23
Tableau 04 : Exemple de Calcul de la densité optique moyenne du contrôle négatif « DO R3».....	28
Tableau 05 : les réactifs de Monolisa™ HBs Ag ULTRA Confirmatory.....	30
Tableau 06 : Exemple d'interprétation des résultats par le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA Confirmatory	32
Tableau 07: Prévalence générale de l'AgHBs chez les sujets dépistés	35



INTRODUCTION

Introduction

Les virus sont des petits parasites intracellulaires obligatoires qui, par définition, contiennent un génome d'ARN ou d'ADN entouré d'une couche protectrice protéique codée par le virus. Les virus peuvent être considérés comme des éléments génétiques mobiles, très probablement d'origine cellulaire et caractérisés par une longue coévolution du virus et de l'hôte. Pour la propagation, les virus dépendent de cellules hôtes spécialisées fournissant la machinerie métabolique et biosynthétique complexe des cellules eucaryotes ou procaryotes (*GELDERBLOM, H R. 1996*).

Le virus d'hépatite B (VHB) est un virus enveloppé à ADN transmis de manière horizontale chez l'adulte, principalement par le sang contaminé, selon divers modes d'exposition (soins et actes invasifs) et par les rapports sexuels (*MICHEL, L. 2016*). Le Virus de l'hépatite B contient différentes protéines utiles au diagnostic : une protéine d'enveloppe appelée antigène de surface de l'hépatite B (Antigène HBs) ou antigène Australia, l'antigène de capsid (antigène HBc), l'antigène E (antigène HBe) et un ADN polymérase (*SCHAECHTER, M. 1999*). 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 (*SBAI, A. 2012*).

Malgré l'existence d'un vaccin efficace, les infections chroniques dues au virus de l'hépatite B (VHB) touchent environ 240 millions de personnes dans le monde (*DUDA, A. 2015*). Ce virus occupe une place importante en termes de santé publique, puisque l'infection par le VHB est mondialement répandue : on considère que 200 à 350 millions d'individus dans le monde sont porteurs chroniques du VHB et que ce virus est responsable de 2 millions de morts par an. La prévalence des hépatites B varie selon les régions géographiques (*WAGNER, A et al. 2004*).

L'Algérie est un pays de moyenne endémicité pour le VHB, sa prévalence est estimée à 2.15 % dans la population générale selon une étude de séroprévalence nationale qui remonte à 1998 (*TEBBAL S et al. 1998*), ce qui correspond à environ 700000 personnes infectées de façon chronique par le virus B, constituant ainsi un important réservoir viral, pérennisant la transmission du virus (*MALLEM, L. 2015*).

Le dosage immuno-enzymatique (ELISA) est une technique utile pour l'analyse quantitative de l'expression de l'antigène de surface cellulaire qui a été développée sur la base de

Introduction

L'immunohistochimie enzymatique (EIH) et de l'ELISA. Depuis son développement, rendu possible par la mise en place de la technologie des anticorps monoclonaux, une large gamme de types de cellules et de molécules de surface a été analysée par ELISA cellulaire (*LOURENÇO, E V et al. 2010*).

Le but de notre travail consiste à dépister les antigènes de surface AgHBs du VHB par l'utilisation des tests immunoenzymatiques de type ELISA sandwich, au niveau du laboratoire privé d'analyses médicales de Larbaa, wilaya de Blida.

PARTIE 01 :
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITE SUR LE VIRUS DE L'HÉPATITE B (VHB).

I.1- La découverte du VHB

Ce n'est qu'en 1945 que l'on a incriminé des agents ultra-filtrables dans la transmission de la maladie ; les termes d'hépatites A et B ont été introduits en 1947 par Mac Callum. La découverte en 1964 de l'antigène Australia (futur Ag HBs) revient à Bulmberg (prix Nobel en 1976) mais, en réalité, le lien existant entre l'antigène Australia et l'hépatite de la seringue (B ou transfusionnelle) fut établi par Prince et Viernucci. En 1970, Dane décrit le virion ou « particule de Dane ». en 1976, Maupas et al, publient les premiers essais mondiaux d'un vaccin contre l'hépatite B préparé à partir d'antigène viral (Ag HBs) extrait de plasmas humains ; ce vaccin plasmatique a, par la suite, été suivi des vaccins actuels obtenus par génie génétique (*DENIS, F. 1999*).

I.2- Définition et classification du VHB

Le virus de l'hépatite B humain (HBV) est un petit virus hépatotrope enveloppé (*PATIENT, R. 2008*) à ADN circulaire partiellement bicaténaire (*ZOULIM, F. et TRÉPO, C. 1997*) caractérisé par une certaine hétérogénéité génomique, qui a un intérêt épidémiologique, diagnostique et pronostique (*WAGNER, A. 2004*). Appartient à la famille des Hepadnaviridae (*ZOULIM, F. et TRÉPO, C. 1997*) qui regroupe deux genres : les Orthohepadnavirus et les Avihepadnavirus. Ces derniers diffèrent du point de vue de la structure de leur génome ainsi que de la pathogénèse qu'ils induisent (*FOURNIER, M. 2014*). Le genre Orthohepadnavirus comprend le virus de l'hépatite B humaine, ainsi que les virus des rongeurs ; Woodchuck hepatitis B virus ou WHBV chez la marmotte (Summers et al., 1978), Ground Squirrel hepatitis B virus ou GSHBV chez les tamias ou l'écureuil fouisseur (Marion et al., 1980). Le genre Avihepadnavirus rassemble les virus de l'hépatite B du canard de Pékin (Duck Hepatitis B virus, DHBV) (Mason et al., 1980), du héron (Heron Hepatitis B virus, HHBV) (Sprengel et al., 1988), et de l'oie blanche des neiges (Snow Goose Hepatitis B virus, SGHBV) (Chang et al., 1999) (*BEKONDI, C. 2008*). Dont l'une des particularités est de répliquer son génome par l'intermédiaire d'une transcriptase inverse virale. Le VHB est à l'origine d'infections chroniques dont les conséquences sont redoutées : hépatite chronique active, cirrhose et carcinome hépatocellulaire. Il n'est pas cytopathogène et c'est le conflit immunitaire entre la réponse cytotoxique contre les hépatocytes infectés et la persistance de l'infection virale qui est à l'origine des lésions hépatiques chroniques (*ZOULIM, F. et TRÉPO, C. 1997*).

I.3- Propriétés physico-chimiques

Bien qu'il soit enveloppé, le VHB est relativement résistant. En effet, à l'extérieur de l'hôte, le VHB survit dans le sang pendant plusieurs semaines. Il est le seul virus enveloppé capable de résister pendant 7 jours à 25°C dans l'environnement (sur les surfaces). L'infectivité d'un sérum contagieux est stable à 37°C pendant 60 minutes (min) et persiste pendant des années à -70°C. Le VHB est sensible à l'hypochlorite de sodium à 5%, à l'éthanol à 70%, au glutaraldéhyde à 2%, et au formaldéhyde. L'infectivité est cependant détruite après quelques minutes à 100°C (*BEKONDI, C. 2008*).

I.4- Structure du VHB

On distingue dans le sérum d'un patient infecté, trois types de particules : les particules virales infectieuses (particules de Dane) et les particules non infectieuses. Ces dernières correspondent à des billes et bâtonnets constitués d'enveloppes vides et sont présentes en large excès (1000 fois plus par rapport aux particules infectieuses) (*DUDA, A. 2015*). Les particules virales infectieuses de 40 à 48 nm de diamètre, appelées particules de Dane correspondant aux virions complets. Elles sont les moins fréquentes et sont constituées d'un core (nucléocapside contenant un ADN partiellement bicaténaire associé à une ADN polymérase) et d'une enveloppe. Les particules sphériques ou sphérules, très nombreuses, de 18 à 25 nm de diamètre et des filaments ou tubules de 22 nm de diamètre sur 50 à 250 nm de longueur qui pourraient être des sphères agrégées. Ces deux derniers éléments ont la même structure que l'enveloppe virale et portent l'AgHBs. Ils se composent d'une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique et ont un diamètre de 25 à 27 nm. Ces sphérules et filaments, non infectieux, sont produits en excès. Il peut y avoir en moyenne 3.10^{13} sphères pour 2.10^{12} filaments et 2.10^{10} particules de Dane dans 1 mL de sérum d'un sujet infecté (voir figure 01) (*BEKONDI, C. 2008*).

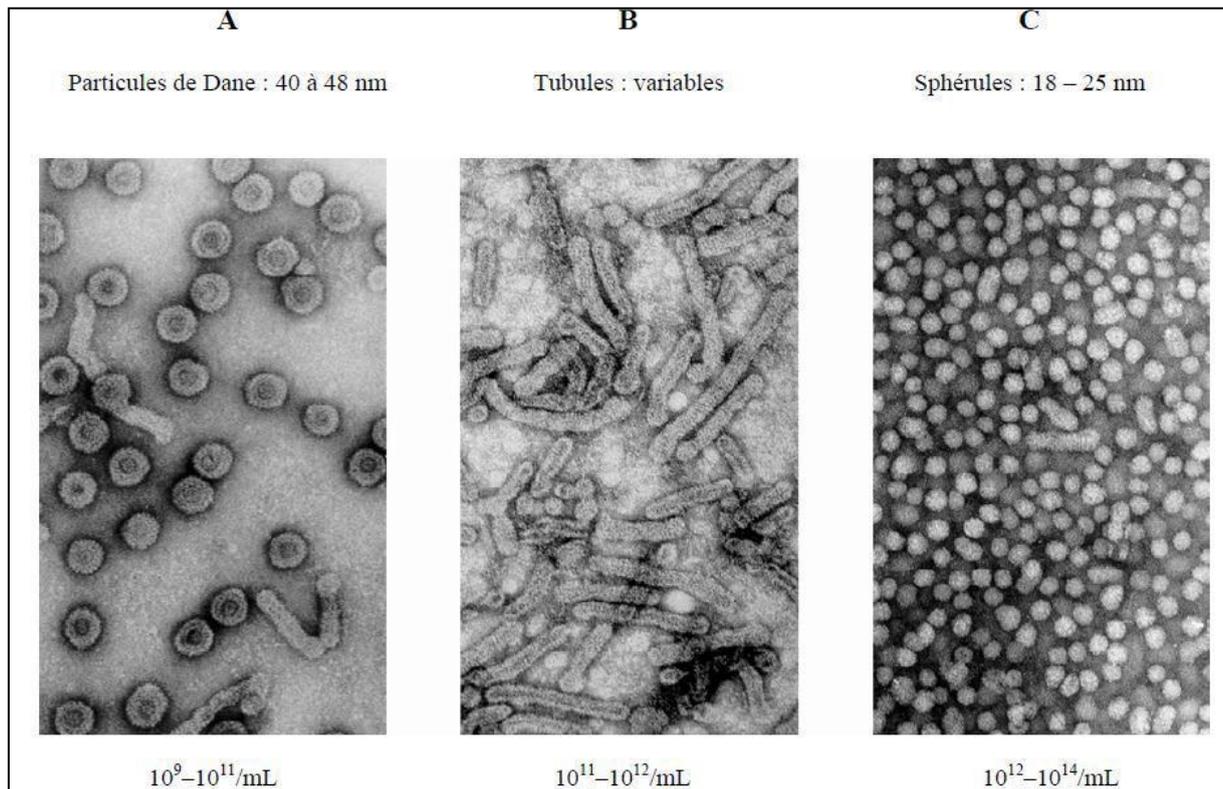


Figure 01 : Photographie en microscopie électronique des particules virales. Dans le sérum d'un patient chroniquement infecté, on distingue les trois formes de particules : virion complet ou particules de Dane (A) infectieux, filaments ou tubules (B) et sphères ou sphérules (C), non infectieux et constitués seulement d'antigène de surface (AgHBs). (D'après Doerr HW and Gerlich WH, In: Medizinische Virologie Verlag, 2002) (*BEKONDI, C. 2008*).

I-5 Structure du virion

Le virion, ou particule de Dane, est un virus enveloppé possédant une capsidie icosaédrique formée d'un seul type de protéine (protéine C, correspondant à l'antigène HBc) qui renferme une molécule d'ADN circulaire, partiellement double brin avec un brin complet de polarité négative (–) et un brin de polarité positive (+) qui ne représente que 50 à 80% du génome. L'ADN est associé à la polymérase virale et à une protéine terminale attachée au brin long. La nucléocapsidie est entourée d'une enveloppe lipidique qui dérive du réticulum endoplasmique (RE) et qui porte trois glycoprotéines de tailles différentes (L ou Large, M ou Medium et S ou small) ayant toutes la même spécificité antigénique HBs (voir figure 02) (*BEKONDI, C. 2008*).

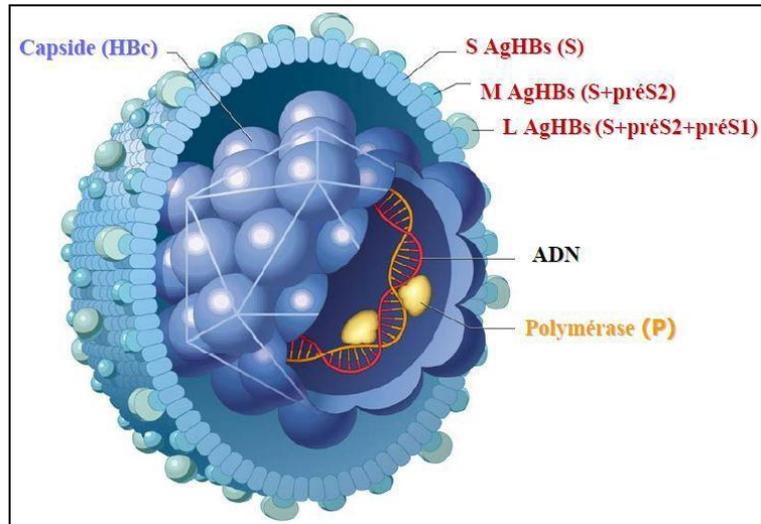


Figure 02 : Structure du VHB. L'enveloppe est constituée par des sous-unités protéiques codées par les gènes S, préS1 et préS2. La capside est formée par l'union de plusieurs sous-unités HBc. Elle contient l'ADN du virus et les enzymes impliquées dans la réplication. <http://www.molecular-virology.uni-hd.de> (**BEKONDI, C. 2008**).

I.6- Organisation génétique du VHB

I.6.1- Structure de l'ADN

Le VHB est un virus à ADN circulaire, partiellement bicaténaire, d'environ 3 200 nucléotides [GANEM, D. 1987, TIOLLAIS, P. 1985]. L'ADN du virion est formé par un brin de polarité négative (brin (-)) codant de longueur constante et d'un brin court de polarité positive (brin (+)) de longueur variable (50 à 100 % de la taille du génome). L'ADN peut être rendu totalement bicaténaire sous l'action de l'ADN polymérase virale endogène contenue dans la nucléocapside virale. Le maintien de la forme circulaire de l'ADN est assuré par l'appariement des extrémités 5' des deux chaînes dans une région d'une longueur de 200 nucléotides appelée région cohésive. Une protéine, la polymérase virale, et un oligoribonucléotide sont respectivement attachés aux extrémités 5' du brin (-) et du brin (+) (voir figure 03) (**ZOULIM, F et TRÉPO, C. 1997**).

I.6.2- Carte génétique du VHB

La carte génétique du VHB a pu être établie en comparant les différentes séquences des génomes clonés. Seul le brin (-) est codant. Il contient quatre phases de lecture ouvertes correspondant aux régions codant pour les protéines virales. Les quatre régions codantes (C, P, S et X) se chevauchent du fait de l'organisation compacte du génome viral. La région C est

Synthèse bibliographique

composée du gène C, qui code pour une protéine de capsid HBC, et d'une région pré-C impliquée dans la synthèse de l'Ag HBe circulant [SCHLICHT, HJ. 1987]. La région P recouvre 80 % du génome et code pour une protéine d'environ 90 kDa, l'ADN polymérase virale [CHANG, LJ. 1990]. La région S code pour les protéines d'enveloppe [HEERMANN, KH. 1984]. Elle est composée du gène S, de la région pré-S1 et de la région pré-S2. Le gène S code pour l'antigène de surface HBs et les régions pré-S et S pour les antigènes de surface pré-S2 et pré-S1. La région X code pour une protéine de 17 kDa dont le rôle n'est pas encore déterminé de façon précise mais qui, bien que non nécessaire à la réplication du génome viral proprement dite, serait indispensable pour établir l'infection virale *in vivo* [ZOULIM, F. 1994]. Des séquences directement répétées (DR1 et DR2) de 11 nucléotides sont situées de part et d'autre de la région cohésive. DR1 est localisée à l'extrémité 5' du brin (-) (ainsi que dans la séquence redondante en 3') et DR2 à l'extrémité 5' du brin (+). Ces séquences jouent un rôle majeur dans l'initiation de la synthèse de chacun des deux brins d'ADN viral. Un signal de polyadénylation TATAAA est présent à l'extrémité 5' de la région C et joue un rôle majeur dans la transcription des ARNm viraux. Deux régions activatrices (enhancer) possédant une spécificité hépatocytaire ont également été détectées dans le génome viral [SCHALLER, H. 1991] : l'une en amont du gène X (enhancer I), l'autre en amont du promoteur C (enhancer II). Des facteurs nucléaires de transcription se liant à des sites spécifiques de ces régions activatrices ont été identifiés. Ces facteurs de transcription sont complexés à l'ARN polymérase II cellulaire. Ils se lient à l'ADN viral et permettent donc de cibler l'ARN polymérase II sur le promoteur viral et, ainsi, d'activer la transcription. Il a été montré *in vitro* que la protéine X et un certain type de protéines pré-S2/S tronquées seraient capables de transactiver une variété de promoteurs cellulaires et viraux dont l'enhancer I, le promoteur C et le promoteur pré-S2/S du VHB [SCHEK, N. 1991]. La protéine X ne se liant pas directement à l'ADN, il a donc été suggéré qu'elle pourrait agir en s'associant à et/ou en activant différents facteurs de transcription nucléaires. Cette activation par la protéine X de facteurs de transcription pourrait être sous la dépendance du système de transduction du signal par la protéine kinase C ou d'autres voies de transduction [KEKULE, AS. 1993]. Plusieurs équipes ont suggéré que la protéine X pourrait aussi se lier au complexe du protéasome et modifier ainsi la dégradation de certains facteurs de transcription [HUANG, J et al. 1996] (voir figure 03) (ZOULIM, F et TRÉPO, C. 1997).

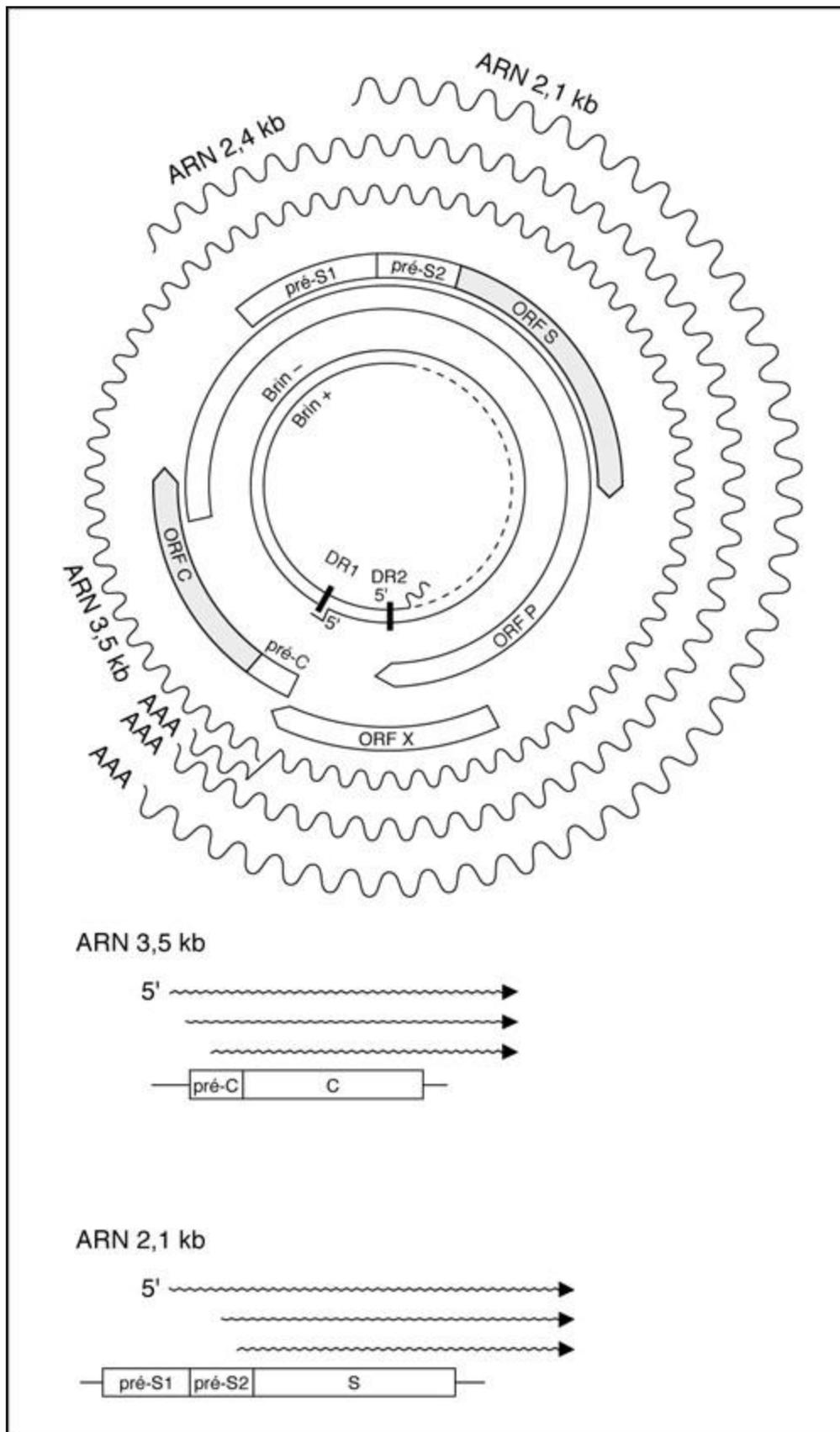


Figure 03 : Le génome du VHB et les transcrits viraux (ZOULIM, F et TRÉPO, C. 1997).

I.7- Cycle de vie du VHB

La première étape de l'infection virale est caractérisée par l'attachement du virus aux cellules cibles, dans ce cas-ci les hépatocytes. Lorsque le VHB rencontrera les cellules hépatiques, il devra pénétrer celles-ci pour s'y répliquer. Pour ce faire, il a été proposé que l'antigène pré-S1 de la protéine de surface L soit responsable de l'attachement de la particule virale au récepteurs membranaires de l'hépatocyte (Locarnini et Zoulim, 2010; Urban et Gripon, 2002). Les récepteurs cellulaires responsables de l'attachement n'ont toutefois pas encore été définis (**TREMBLAY, M P. 2016**). Après internalisation par endocytose, les virus libèrent leurs nucléocapsides dans le cytoplasme. Les nucléocapsides migrent ensuite vers le noyau de l'hôte dans lequel elles libèrent l'ADNrc (relâché circulaire) à travers les pores nucléaires. Cet ADNrc est complété et converti en ADNccc (ADN circulaire clos covalent), organisé en mini-chromosome, qui servira de matrice pour la synthèse des 4 ARN viraux dont l'ARNpg (ARN pré-génomique). Les ARN viraux transcrits sont alors exportés dans le cytoplasme où ils sont traduits pour produire les différentes protéines virales. L'originalité de ce cycle réside dans le fait qu'une étape de transcription inverse est nécessaire à partir de l'ARNpg pour synthétiser de l'ADNrc (**ZHANG, X et al. 2016**). En effet, l'ARNpg est encapsidé et rétro-transcrit par la polymérase virale formant un intermédiaire de répllication de type ADN de polarité négative (-). La polymérase virale assure ensuite l'initiation de la synthèse du second brin (+). Les nucléocapsides nouvellement formées peuvent alors acquérir une enveloppe virale afin de former de nouveaux virions qui seront ensuite sécrétés hors de la cellule (voir figure 04) (**LOCATELLI, M et TESTONI, B. 2017**).

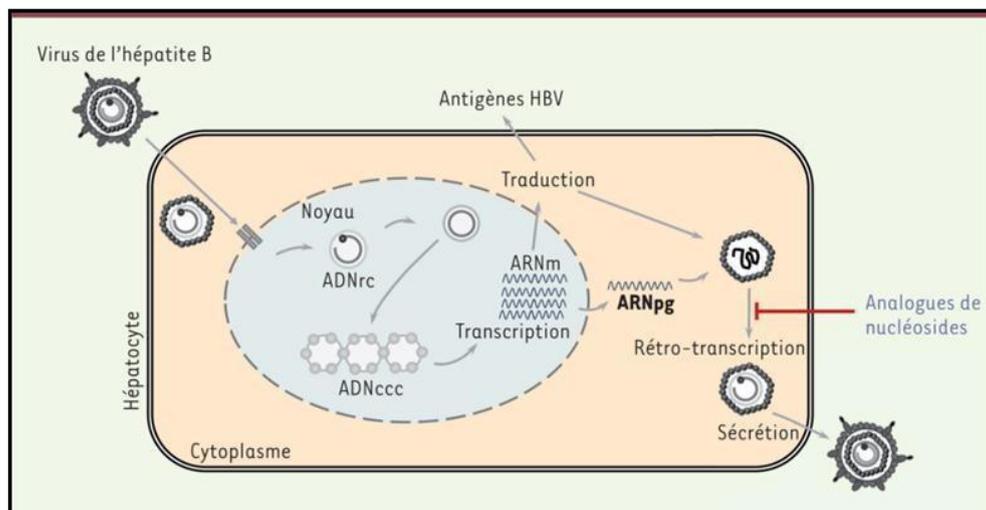


Figure 04 : Cycle de répllication du virus de l'hépatite B (LOCATELLI, M et TESTONI, B. 2017).

I.8- Réponses immunitaires au cours de l'infection par le VHB

I.8.1- Réponse innée

Lors des premières phases de l'infection, le virus échappe complètement à la réponse immunitaire innée. En effet, des études ont montré l'absence de mécanismes antiviraux intracellulaires comme l'absence de production d'interféron par les hépatocytes (Jeulin et al., 2013). Le foie est un organe de tolérance, il est capable de prévenir toute attaque trop importante du système immunitaire qui pourrait le mettre en danger. Les cellules infectées produisent des cytokines immunosuppressives comme l'IL 10 ou le TGF β . Ainsi les fonctions antivirales des lymphocytes NK, naturellement retrouvés en grande quantité dans le foie, sont inhibées (Michel, 2014). L'absence de réponse immunitaire innée permettrait une expansion du VHB dans les hépatocytes durant la phase précoce (*DUDA, A. 2015*).

I.8.2- Réponse adaptative

Une réponse adaptative ou spécifique se met rapidement en place suite à la phase précoce et permet ainsi de contrôler l'infection. Les antigènes du VHB vont être phagocytés par les cellules présentant l'Ag (comme les cellules dendritiques) puis dégradés et présentés par les molécules du CMH classe I ou CMH classe II aux lymphocytes T CD8 et CD4 respectivement. Ainsi la réponse immunitaire cellulaire spécifique est amorcée. Lors de l'infection aiguë résolutive, les réponses des lymphocytes T cytotoxiques CD8 et des lymphocytes T auxiliaires CD4 sont vigoureuses, polyclonales et spécifiques de la majorité des protéines virales. Les LT CD8 cytotoxiques reconnaissent les épitopes portés par les molécules de classe I à la surface des hépatocytes. Ils sont responsables des lésions hépatiques, par lyse des hépatocytes par contact direct, et de la libération des transaminases. Ils jouent également un rôle dans la synthèse de cytokines comme l'Interféron γ et du TNF α . Ces cytokines ont des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la réplication intracellulaire du virus. D'un autre point les LT CD4 sont les chefs d'orchestre du système immunitaire : ils permettent d'amplifier la réponse des LT CD8 nécessaires à la clairance virale, et d'initier la réponse humorale (Ganem and Prince, 2004). Les lymphocytes B spécifiques des antigènes vont être activés par l'intermédiaire de l'IL2 pour devenir des plasmocytes sécrétant des anticorps neutralisants. Les anticorps spécifiques de l'enveloppe virale (Ac anti-HBs) vont également jouer un rôle majeur dans l'immunité protectrice contre le VHB (Petit and Treppe, 2014). La destruction des cellules infectées par les LT cytotoxiques, associée à la neutralisation des virions et particules virales par les anticorps circulants va permettre la résolution de l'infection

aiguë. Ces différentes réponses expliquent que l'infection est le plus souvent bien contrôlée chez le sujet immunocompétent (voir figure 05) (DUDA, A. 2015).

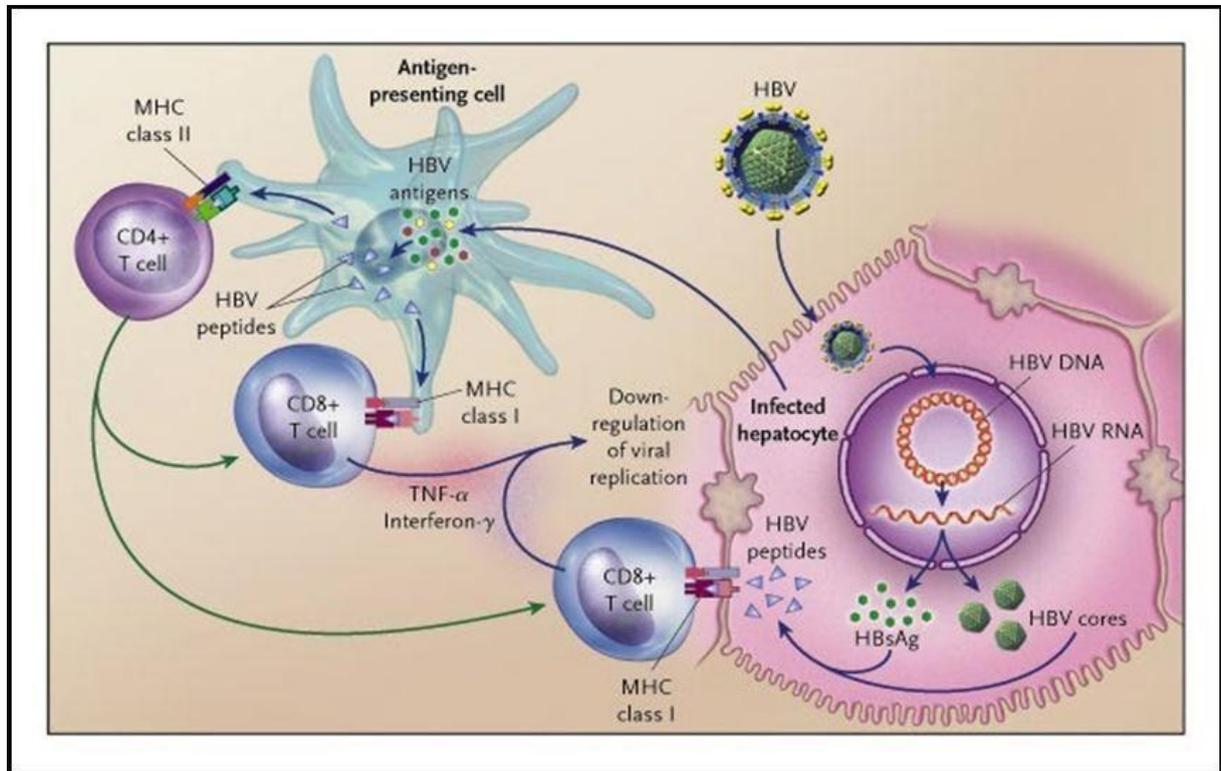


Figure 05 : Réponse immunitaire cellulaire contre le VHB (Ganem and Prince, 2004) (DUDA, A. 2015).

I.9- Épidémiologie et modes de transmission

I.9.1- Prévalence

Le réservoir du VHB est strictement humain. Dans le monde, deux milliards d'individus ont été infectés par le VHB (présence d'anti-HBc) et 350 millions sont porteurs chroniques du virus (présence d'ag-HBs). Le VHB est directement responsable de deux millions de décès par an. Cette maladie endémique a une extension mondiale et sévit sans prédominance saisonnière. La prévalence de porteur d'ag-HBs varie selon les régions du globe :

- ✚ 1 % pour l'Europe de l'Ouest, l'Amérique du Nord et l'Australie ;
- ✚ 1 à 5 % pour les pays d'Amérique latine, l'Afrique du Nord, l'Europe de l'Est, la Russie, le Moyen-Orient et l'Inde ;
- ✚ 5 à 25 % pour l'Afrique subsaharienne, l'Asie du Sud et l'Indonésie (voir figure 06) (LE FAOU, A. 2012).

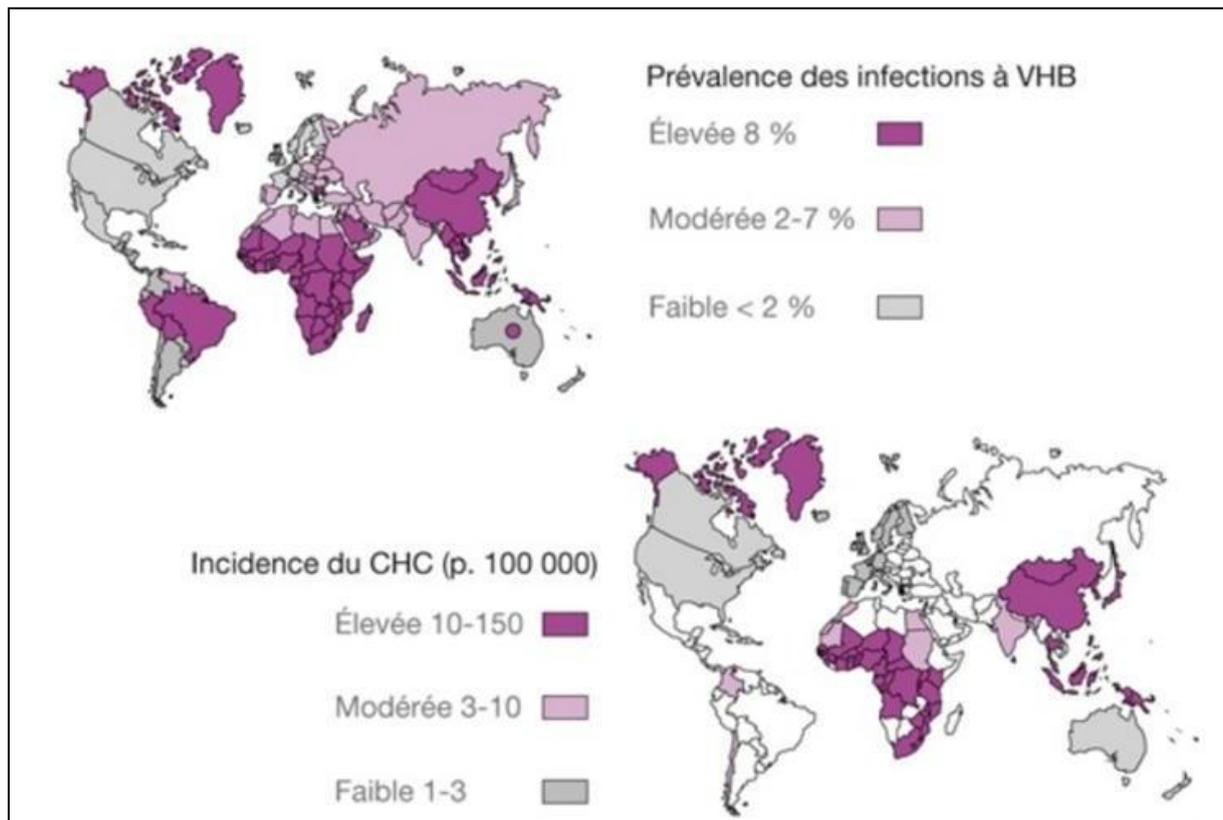


Figure 06 : Prévalence mondiale du VHB et du carcinome hépatocellulaire (CHC) (LE FAOU, A. 2012).

1.9.2- Mode de transmission

Le virus est présent à concentration élevée dans le sang des sujets infectés, dans les sécrétions génitales, dans le sperme et, à concentration plus faible, dans la salive, le lait, les urines et les larmes. Les principaux modes de transmission sont la transmission matérno-foetale au moment de l'accouchement et, chez l'adolescent et l'adulte la voie sexuelle. Les toxicomanes ainsi que les adeptes du « piercing » et du tatouage s'exposent à une transmission par le sang par défaut d'hygiène (voir tableau 01) (LE FAOU, A. 2012).

Tableau 01 : Modes de transmission du VHB (LE FAOU, A. 2012).

Verticale : mère/enfant	
– À l'accouchement	Mode de transmission important dans les pays d'endémie
– En période néonatale	
– Passage transplacentaire exceptionnel	
Parentérale	
– Transfusion : sang et ses dérivés	Depuis la mise en place de mesures préventives, la transmission par les actes médicaux est devenue exceptionnelle dans les pays occidentaux
– Traitements par des produits sanguins (hémophiles)	
– Hémodialyse	
– Greffe d'organes ou de tissu	
– Toxicomanie IV (seringues ou aiguilles souillées)	Difficile à contrôler
– Tatouages ou « piercing »	Nulle si les mesures d'hygiène sont prises
– Soins sans matériel à usage unique	Risque élevé dans les pays en développement
– Contaminations professionnelles	Risque persistant en milieu hospitalier
Horizontale (non sexuelle)	
– Enfant/enfant (jeux)	Faible
– Intra-familiale	Nécessite des précautions particulières
– Sports de contact	Faible dans les pays de faible prévalence
Sexuelle	
– Hétérosexuelle	Premier mode de transmission dans les pays occidentaux
– Homosexuelle	Risque élevé dans les pays en voie de développement

I.10- Infection par le VHB :

L'infection par le virus de l'hépatite B se caractérise par une phase aiguë et une phase chronique. L'hépatite aiguë. Parfois symptomatique (syndrome pseudo-grippal et ictère), guérit dans 80 % des cas. Ce n'est que lorsqu'elle évolue depuis plus de 6 mois que l'on parle d'hépatite chronique. Les traitements qui seront envisagés ici ne concernent que le traitement des hépatites chroniques. Au cours de l'évolution de l'infection chronique par le VHB, l'hépatite chronique, on peut distinguer plusieurs phases qu'il convient de bien distinguer avant d'envisager un traitement :

- ✚ Une phase de tolérance immunitaire. Elle est caractérisée par la présence de marqueurs de réplication virale avec AgHBe positif et ADN VHB en quantité extrêmement élevée. Les transaminases sont généralement normales. Cette phase est plus fréquente et plus prolongée chez les patients infectés au cours de la période néonatale ;

Synthèse bibliographique

- ✚ Une phase d'infection chronique par le virus sauvage. Au cours de cette phase, le système immunitaire est activé et se constituent des lésions histologiques chroniques de nécrose et d'inflammation du foie. On trouve dans le sérum des marqueurs de multiplication virale : AgHBe positif, ADN VHB en quantité moins importante que lors de la phase précédente, élévation des transaminases. Des lésions d'hépatite chronique sont mises en évidence à la biopsie hépatique. C'est la phase idéale pour débiter un traitement antiviral. Cette phase peut survenir après des années de phase d'immunotolérance, et est observée plus fréquemment chez les sujets infectés à l'âge adulte ;
- ✚ Une phase de portage inactif. Spontanément ou sous l'effet des traitements antiviraux, le système immunitaire contrôle l'infection virale et la réplication est de moindre importance. On constate alors une séroconversion HBe avec négativation de l'AgHBe, apparition de l'anticorps anti-HBe et diminution de l'ADN VHB en dessous de 104 copies/ml. Les transaminases sont normales. On ne trouve pas de signe de nécrose et d'inflammation à la biopsie hépatique. Néanmoins, il persiste dans les hépatocytes infectés de l'ADN super enroulé qui peut être à l'origine d'une réactivation virale. Par ailleurs, le génome viral peut être intégré dans le génome de l'hôte, pouvant être responsable de carcinome hépatocellulaire. Des lésions de fibrose séquellaires peuvent être présentes à ce stade. Au cours de cette phase peuvent survenir des épisodes de réactivation virale avec des niveaux variables d'ADN VHB, de transaminases et d'activité histologique. Ces patients sont alors infectés par des mutants du VHB avec AgHBe négatifs. Ces mutations siégeant dans la région pré-C ou dans le promoteur de la région « core » ne permettent pas l'expression normale de l'AgHBe. Il peut être difficile de distinguer les patients avec une vraie maladie inactive, AgHBe négatifs, pour lesquels le pronostic est bon des patients avec maladie active, AgHBe négatifs, qui peuvent avoir des phases de rémission, mais dont le pronostic est beaucoup plus réservé, avec risque de cirrhose et des complications de celle-ci ;
- ✚ Une phase plus tardive, caractérisée par l'élimination de l'antigène HBs avec apparition d'anticorps anti-HBs. À ce stade, des cellules comportant de l'ADN viral super enroulé et des cellules comportant du génome viral intégré dans le génome de l'hôte persistent dans le tissu infecté. La « guérison » n'est donc qu'apparente. Ce stade correspond généralement sur le plan histologique à une cirrhose (voir figure) (**BOUVENOT, G. 2011**).

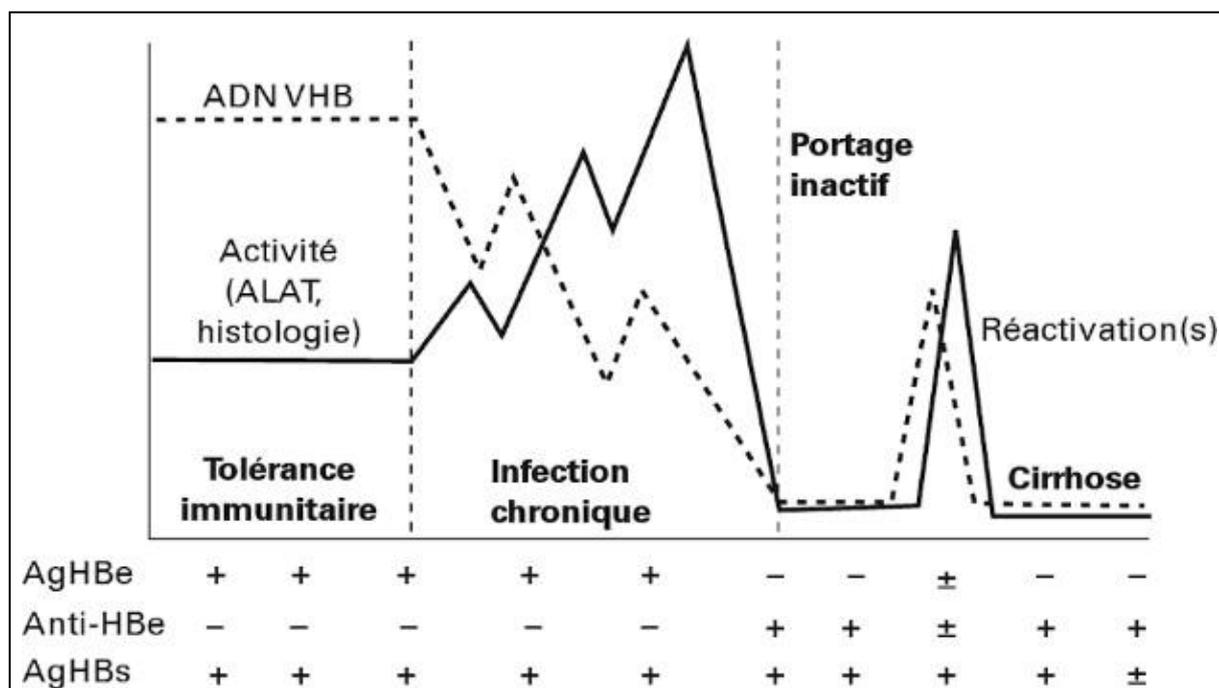


Figure 07 : Évolution de l'infection par le VHB : les quatre phases (d'après P. Marcellin, *EASL, Genève, 2002*) (*BOUVENOT, G. 2011*).

I.11- Les marqueurs sériques du VHB

Le diagnostic de l'infection par le VHB et de la maladie associée repose sur une constellation de résultats cliniques, biochimiques, histologiques et sérologiques. Un certain nombre d'antigènes viraux et leurs anticorps respectifs peuvent être détectés dans le sérum après infection par le VHB, et une interprétation correcte des résultats est essentielle pour le diagnostic correct des diverses formes cliniques de l'infection par le VHB (voir tableau 02) (*LIANG, T. J. 2009*).

Tableau 02 : Marqueurs sérologiques et virologiques du virus de l'hépatite B (*Liang, T. J. 2009*).

HBsAg	Infection par le VHB, aiguë et chronique
HBeAg	Réplication et infectiosité du VHB de haut niveau; marqueur pour la réponse au traitement
ADN du VHB	Niveau de réplication du VHB; marqueur virologique primaire pour la réponse au traitement
Anti-HBc (IgM)	Infection aiguë par le VHB; pourrait être vu dans la poussée de l'hépatite chronique B

Synthèse bibliographique

Anti-HBc (IgG)	Infection à VHB retrouvée ou chronique
Anti-HBs	Infection à VHB récupérée ou marqueur de vaccination contre le VHB; immunité à l'infection par le VHB (le titre peut être mesuré pour évaluer l'efficacité du vaccin)
Anti-HBe	Réplication et infectivité du VHB de bas niveau; marqueur pour la réponse au traitement
Anti-HBc (IgG) et anti-HBs	Infection par le VHB antérieure; pourrait perdre anti-HBs
Anti-HBc (IgG) et HBsAg	Infection chronique par le VHB
Anti-HBc (IgG) et / ou anti-HBs et ADN du VHB (PCR)	Infection HBV latente ou occulte

I.12- Le diagnostic du VHB

I.12.1- Diagnostic direct :

- Recherche du génome viral: PCR quantitative ou hybridation moléculaire sur sérum/ plasma (détection en temps réel) permettant de détecter et de quantifier la réplication virale.
- Séquençage du génome viral : recherche de mutant pré-C (région précédant le gène C), génotypage ou recherche de mutations associées à la résistance (tests spécialisés).
- Recherche d'antigènes spécifiques: AgHBs (surface) signant un portage du virus, AgHBe (pré-C) signant normalement une réplication importante. L'AgHBc (capside) n'est présent qu'au niveau hépatique (*PASQUIER, C et al. 2017*).

I.12.2- Diagnostic indirect :

- Recherche d'anticorps spécifiques: Ac anti-HBs signant une immunité protectrice post-infectieuse (guérison) ou post-vaccinale (absence d'Ac anti-HBc associés) si > 10 mUI/mL. Ac anti-HBc signant une immunité post-infectieuse non protectrice. Les IgM anti-HBc signent normalement une infection récente (hépatite aiguë),

Synthèse bibliographique

mais peuvent être présentes lors d'une hépatite chronique. Ac anti-HBe signant la présence d'une réplication faible (absence AgHBe) ou, si l'ADNnémie est élevée, celle d'un virus mutant pré-C n'excrétant pas l'AgHBe. Recherche d'une cytolysé hépatique avec élévation des transaminases (ALAT > ASAT) parfois très importante. Hyperbilirubinémie, hyperlymphocytose modérée (*PASQUIER, C et al. 2017*).

I.12.3- Diagnostic différentiel

- ✚ Avec les autres hépatites virales aiguës à transmission parentérale (HCV) en particulier ou féco-orale (HAV, HEV). En cas de retour des tropiques penser à une fièvre hémorragique (fièvre jaune, dengue, ...) ou à une leptospirose. Chez l'immunodéprimé rechercher une hépatite à CMV ou à un autre Herpesviridae. Rechercher systématiquement en cas d'AgHBs des marqueurs d'infection par HDV (virus satellite du HBV, coinfection ou surinfection), Ac totaux, ARN (*PASQUIER, C et al. 2017*).

I.14- Traitement prophylactique ou curatif

I.14.1- Prophylaxie :

- ✚ Vaccin fractionné contenant de l'AgHBs recombinant (protéine S ou pré-S/S, produite dans la levure ou les cellules CHO de hamster). Recommandée pour la population générale dans le calendrier vaccinal (vaccin hexavalent à 2 mois, 4 mois, 12 mois), obligatoire pour le personnel du corps de santé (contrôler les Ac anti-HBs).
- ✚ Dépistage obligatoire de l'AgHBs à 6 mois de grossesse pour, en cas de portage, sérovaccination du nouveau-né à la naissance. Le risque de transmission varie de 30 à 90 % en présence de l'AgHBe à 10-20 % en cas d'AgHBs isolé.
- ✚ Immunoglobulines spécifiques en cas d'exposition (nouveau-né, ...)
- ✚ Préservatif et dépistage des dons de sang, tissus et organes (*PASQUIER, C et al. 2017*).

I.14.2- Traitement :

- ✚ Traitement antiviral spécifique pour les hépatites chroniques après évaluation de l'activité hépatique.
- ✚ Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) : lamivudine, entricitabine, entécavir, telbivudine.

- ✚ Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse du HBV : adefovir dipivoxil, ténovofir dipivoxyl fumarate (*PASQUIER, C et al. 2017*).

CHAPITRE II : L'IMMUNODOSAGE PAR TEST ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY).

II.1- Définition et Principe d'ELISA :

ELISA est l'acronyme d'un examen de laboratoire appelé en anglais enzyme-linked immunosorbent assay, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide. Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (enzyme immunoassays), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par spectrophotométrie, par opposition aux RIA (radio immunoassays) dans lesquels l'anticorps est marqué par un radioélément. Parmi les enzymes les plus utilisées, on compte la peroxydase de raifort (HRP pour horse-radish peroxidase), la phosphatase alcaline, la glucose oxydase et l'acétylcholinestérase. L'addition d'un substrat de l'enzyme, à la dernière étape du dosage, permet la formation d'un composé soluble et coloré, dont l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre. L'ELISA est une technique biochimique permettant de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique utilise un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène. L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps (comme pour le test HIV ou le virus du Nil), que pour détecter la présence d'un antigène (voir figure 08) (*EVEN, K. 2012*).

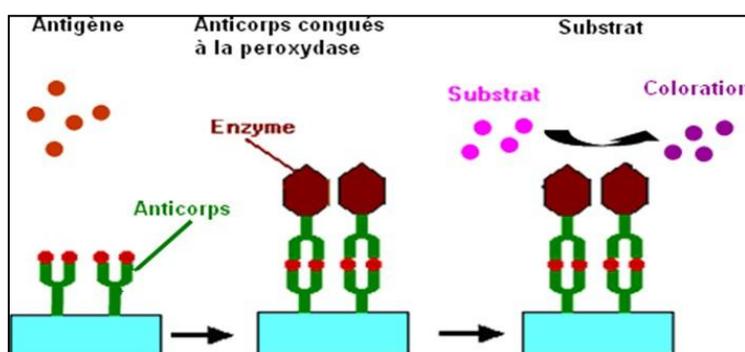


Figure 08: Principe du test ELISA (*SBAI, A. 2012*).

II.2- ELISA direct (d'ELISA)

Dans un premier temps, l'antigène à doser est déposé sur un support solide (généralement une plaque de microtitration). L'antigène est reconnu par un anticorps marqué par une enzyme. Les anticorps en excès, non liés à l'antigène, sont éliminés lors de l'étape de rinçage. L'ajout du substrat permet la réaction colorée dont la DO mesurée est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée sur le support solide (voir figure 09), (BACO, E. 2011).

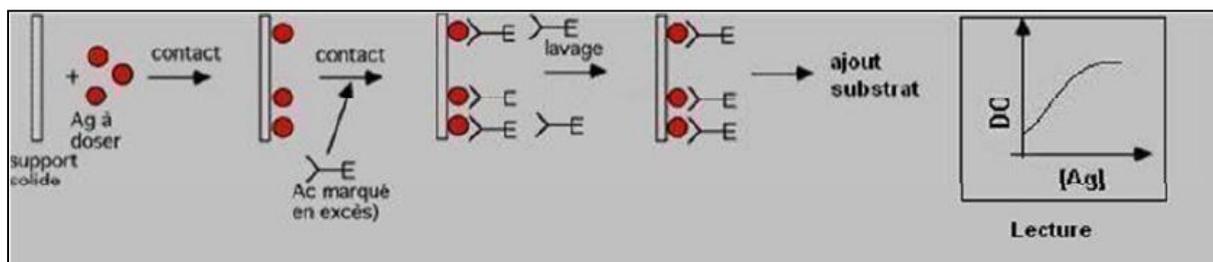


Figure 09 : ELISA direct (BACO, E. 2011).

II.3- ELISA indirect (iELISA)

L'antigène à doser est déposé sur le support solide. Un anticorps, dit primaire, se lie à l'antigène. L'excès d'anticorps est éliminé par rinçage et un anticorps spécifique de l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire (Ac Anti-Ac marqué par une enzyme), est ajouté au milieu. L'ajout du substrat permet la réaction colorée et la DO mesurée va être proportionnelle à la quantité d'anticorps primaires immobilisés sur le support et donc à la quantité d'antigène à doser. Cette technique peut aussi être utilisée pour le dosage d'anticorps spécifiques présents dans un sérum (voir figure 10) (BACO, E. 2011).

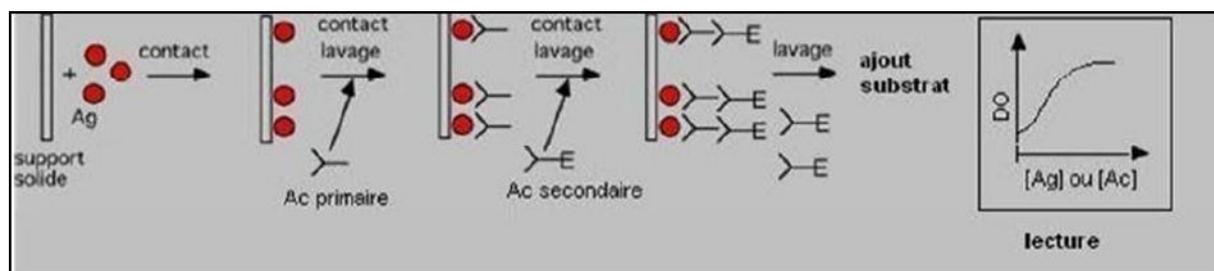


Figure 10 : ELISA indirect (BACO, E. 2011).

II.4- ELISA compétitif direct (cdELISA)

Les anticorps sont fixés sur le support solide. L'antigène à doser est mis en compétition avec des quantités connues d'antigène marqué. Plus la quantité d'antigène à doser sera forte, plus

l'activité enzymatique sera faible et la DO mesurée sera faible. Elle sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'antigène à doser (voir figure 11) (BACO, E. 2011).

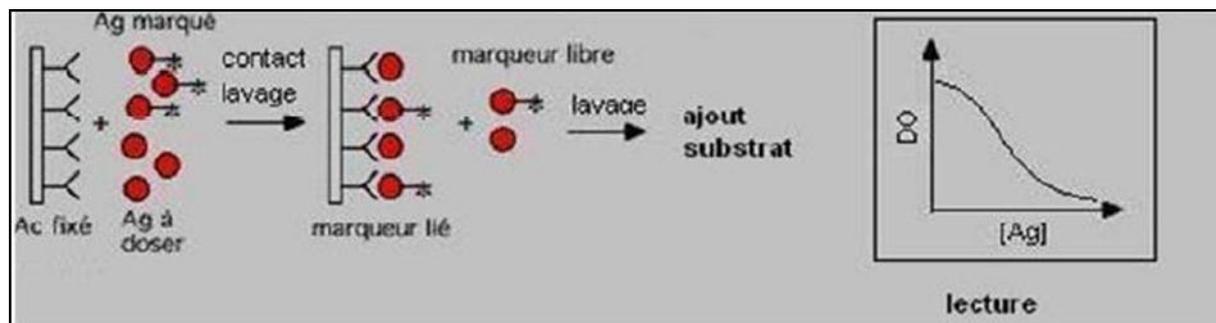


Figure 11 : cdELISA, dosage d'antigènes (BACO, E. 2011).

Les cdELISA permettent aussi de mesurer une concentration inconnue d'anticorps. Pour cela, l'antigène est immobilisé sur le support. L'anticorps à doser est mis en compétition avec des quantités connues d'anticorps marqués. L'anticorps marqué se fixera d'autant plus que l'anticorps à doser sera présent en petite quantité. La DO mesurée sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps à doser (voir figure 12) (BACO, E. 2011).

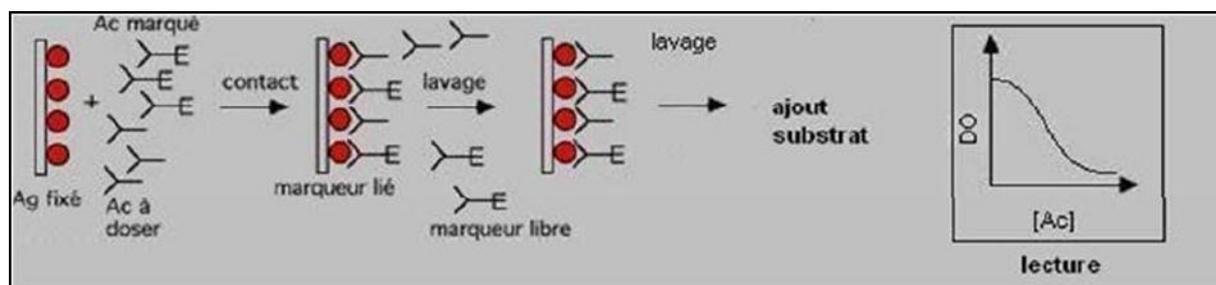


Figure 12 : cdELISA, dosage d'anticorps (Genetet, N. 2002) (BACO, E. 2011).

II.5- ELISA sandwich

C'est une technique extrêmement sensible qui permet la détection d'anticorps ou d'antigènes à de très faibles concentrations. Elle est relativement rapide et économique car elle nécessite peu de réactifs. Les premiers anticorps appelés anticorps de capture sont mis en incubation dans un puits en plastique. Une partie d'entre eux s'adsorbe à la surface du puits. Les anticorps non fixés sont éliminés par lavage (voir figure 13) (WENSIERSKI, S. 2010).



Figure 13 : Anticorps de capture fixé au fond du puits (WENSIERSKI, S. 2010).

Le puits est ensuite rempli d'une solution de saturation qui agit comme un film protecteur des parois de plastique et empêche toute fixation non spécifique ultérieure ; le surplus de cette solution est éliminé par des rinçages successifs (voir figure 14) (WENSIERSKI, S. 2010).

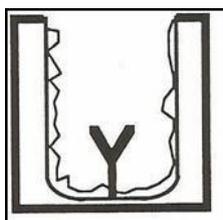


Figure 14 : Puits saturé (WENSIERSKI, S. 2010).

L'antigène à doser est alors ajouté et se fixe aux anticorps. Les antigènes non fixés sont éliminés par des lavages successifs (WENSIERSKI, S. 2010) (voir figure 15).

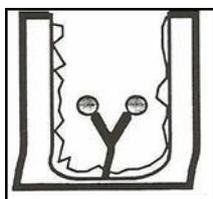


Figure 15 : Liaison anticorps de capture-antigène (WENSIERSKI, S. 2010).

Les complexes anticorps-antigènes formés sont détectés grâce à des anticorps identiques aux premiers mais qui sont couplés à une enzyme. L'antigène est donc pris en sandwich entre deux anticorps. Le surplus d'anticorps lié à l'enzyme est éliminé par rinçages successifs (voir figure 16) (WENSIERSKI, S. 2010).

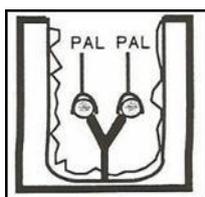


Figure 16 : Fixation des anticorps de détection (WENSIERSKI, S. 2010).

Synthèse bibliographique

Les complexes anticorps-antigènes-anticorps liés à l'enzyme sont révélés par l'ajout d'un substrat incolore dont les produits de dégradation sont colorés. La dégradation est stoppée par une solution adaptée et l'intensité de la coloration mesurée par la densité optique du puits est fonction de la quantité de substrats dégradée et donc de la quantité de « complexe sandwich » formée, elle-même fonction de la concentration en antigènes de départ (*WENSIERSKI, S. 2010*) (voir figure 17).

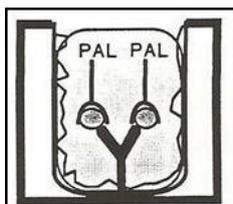


Figure 17 : Révélation par réaction enzymatique (*WENSIERSKI, S. 2010*).

PARTIE 02 :
ÉTUDE
EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I :
MATÉRIEL ET
MÉTHODES

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I-1. Matériel utilisé

a) Matériel biologique :

✚ Les plasmas des patients : le sang a été prélevé sur EDTA (voir annexe 01).

b) Matériel non biologique :

✚ La trousse de Monolisa™ HBs Ag ULTRA pour la détection de l'antigène de surface du virus de l'hépatite b par technique immuno-enzymatique dans le sérum ou le plasma humain.

Tableau 03 : Composition de La Trousse Monolisa™ Hbs Ag Ultra.

Etiquetage :	Nature des réactifs :
R1	Microplaque 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des anticorps monoclonaux anti-HBs (souris)
R2	Solution de lavage concentrée (20X) Tampon tris, NaCl, pH = 7,4
R3 (sans antigène si on veut détecter l'antigène, pour valider les réactifs mais on ajoute le conjugué. Donc il confirme que les réactifs ne sont pas contaminés et qu'un résultat positif est bien dû à notre échantillon et non à un antigène déjà présent dans notre plaque).	Contrôle négatif Tampon Tris HCl, contenant de la SAB
R4 (antigène mais sans anticorps spécifique à l'antigène qu'on veut détecter, sert à valider résultat négatifs dû seulement à l'antigène).	Contrôle positif (Humain) Tampon Tris HCl, contenant de la SAB, additionné d'un mélange d'Ag HBs purifiés des sous-types ad et ay, (humains).
R6	Diluant conjugué Tampon Tris HCl pH 7.4 additionné de BSA, de Tween® 20, d'immunoglobulines de boeuf et de souris et d'un indicateur coloré témoin de dépôt.
R7	Conjugué Anticorps monoclonaux anti-HBs de souris et anticorps polyclonaux anti-HBs de chèvre couplés à la peroxydase, Lyophilisée

R8	Tampon substrat de la peroxydase Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4,0 contenant 0,015% d'H ₂ O ₂ et 4% de dimethylsulfoxyde (DMSO)
R9	Chromogène coloré en rose : solution contenant du tetramethyl benzidine (TMB)
R10	Solution d'arrêt Solution d'acide sulfurique 1 N

- ✚ Micropipette : pour transporter un volume mesuré de liquide (plasma, réactifs)
- ✚ Centrifugeuse : pour faire la centrifugation des échantillons.
- ✚ incubateur/agitateur de microplaques :
 - Appareil pour faire incuber les microplaques à température avec évaporation réduite et avec agitation.
 - Constitué de trois chambres, chaque chambre peut contenir une seule microplaque.
 - Une large gamme de température réglable.
- ✚ Laveur :
 - Appareil permettant le lavage automatique des plaques de micro-titrage.
 - Lavage des microplaques en automatique et programmable.
 - Programmé à trois lavages successifs.
 - Avec deux types d'aiguilles : aiguilles longues pour l'absorption, et autres courtes pour la distribution des solutions.
- ✚ Spectrophotomètre : appareil pour la lecture des plaques de microtitration réalisant des tests immuno enzymatiques (ELISA)
- ✚ Imprimante : pour imprimer les résultats lus par le spectrophotomètre (voir annexe 02)

I.2- Méthodes

I.2.1- Population étudiée

Notre population d'étude était constituée de 219 personnes dont 88 hommes et 131 femmes, venant de quatre villes (Larbaa, Mefteh, Sidi Moussa, Bougara) au laboratoire privé d'analyses médicales de Larbaa, wilaya de Blida, pour un dépistage de l'AgHBs, soit parce qu'ils sont malades (hospitalisés ou non), soit parce qu'ils avaient décidé volontairement de connaître leur statut sérologique.

I.2.2- L'échantillonnage

a. Réception des échantillons

- Il faut s'assurer que toutes les requêtes et les échantillons soient identifiés correctement et lisiblement.
- L'échantillon doit obligatoirement posséder une double identification :

- Le nom et prénom du patient.
- La date de naissance ou Le numéro de dossier du laboratoire du patient.

b. Manipulation des échantillons

- Le sang a été prélevé sur EDTA. Séparer le sérum ou le plasma du caillot ou de globules rouges dès que possible pour éviter toute hémolyse, l'hémolyse importante peut affecter les performances d'essai (voir annexe 03 et 04).
- Dès qu'il y a une coagulation observable, il faut séparer le plasma des caillots de sang.
- Après la centrifugation le sérum est retiré à l'aide d'une micropipette, pour le transférer dans un tube à essais identifié près à la manipulation (voir annexe 05).
- Les agrégats de fibrine peuvent donner des résultats faussement positifs.
- Ne pas chauffer les échantillons. Les échantillons peuvent être conservés à 2-8 ° C si le dépistage est effectué dans les 7 jours ou ils peuvent être surgelés à -20 ° C pendant plusieurs mois. Le plasma doit être décongelé rapidement par le réchauffement de quelques minutes dans un bain marie à 40 ° C (pour éviter la précipitation de fibrine); Ne répétez pas plus de 3 cycles de congélation/décongélation.
- Si les échantillons doivent être livrés, ils doivent être conditionnés conformément à la réglementation en vigueur concernant le transport d'agents étiologiques.

Remarque : Les échantillons hémolysés contenant jusqu'à 10 g / l d'hémoglobine n'affectent pas les résultats.

I.2.3- Dépistage du VHB :

➤ Le but du dépistage :

Monolisa™ HBs Ag ULTRA est une technique immuno-enzymatique de type "sandwich" pour la détection de l'antigène de surface du virus de l'Hépatite B (Ag HBs) dans le sérum ou le plasma humain.

➤ Intérêt de l'analyse biologique dans la mise en évidence du VHB :

La présence de l'Ag HBs dans le sérum témoigne d'une infection par le virus de l'Hépatite B. Il est le premier marqueur à apparaître et peut précéder de 2 à 3 semaines les signes cliniques et biologiques de la maladie.

Sa présence peut être très brève (quelques jours) ou très longue (plusieurs années). Au-delà de 6 mois de persistance de l'Ag HBs, l'Hépatite est qualifiée de "chronique".

L'existence de nombreux porteurs chroniques asymptomatiques fait que l'Hépatite B représente un risque transfusionnel important. La prévention de la transmission repose sur la détection de l'Ag HBs à chaque don de sang.

➤ **Principe du test monolisa™ HBs Ag ULTRA**

Monolisa™ HBs Ag ULTRA est une technique immuno-enzymatique de type "sandwich" en 1 temps utilisant des anticorps monoclonaux et des anticorps polyclonaux sélectionnés pour leur capacité à se lier aux différents sous-types de l'Ag HBs actuellement reconnus par l'OMS et la plupart des souches variantes de l'hépatite B. La phase solide de Monolisa™ HBs Ag ULTRA est sensibilisée avec des anticorps monoclonaux. Les conjugués de Monolisa™ HBs Ag ULTRA sont basés sur l'utilisation des anticorps monoclonaux de souris et des anticorps polyclonaux de chèvre contre l'Ag HBs. Ces anticorps sont couplés à la peroxydase.

Le dosage comprend les étapes suivantes :

- 1) Distribution des échantillons et des sérums de contrôle dans les cupules de la microplaque.
 - Cette distribution peut être contrôlée visuellement : en effet, il y a une nette différence de coloration entre une cupule vide et une cupule contenant un échantillon. Elle peut être aussi contrôlée par lecture spectrophotométrique à 490/620-700 nm (optionnel).
- 2) Distribution du conjugué.
 - Cette distribution peut être également contrôlée visuellement : en effet, après rajout du conjugué initialement rouge, la cupule se colore en rouge. Elle peut être contrôlée par lecture spectrophotométrique à 490/620-700 nm (optionnel), la distribution des échantillons peut aussi être contrôlée à ce stade de la manipulation par lecture spectrophotométrique à 490/620 700 nm.
- 3) Après incubation pendant une heure et demi à 37°C, le conjugué non lié est éliminé par lavage.
- 4) Distribution de la solution de révélation de l'activité enzymatique.
 - Cette distribution peut être également contrôlée visuellement : il y a une nette différence de coloration entre une cupule vide et une cupule contenant le substrat de couleur rose. Elle peut être contrôlée par lecture spectrophotométrique à 490 (optionnel).
- 5) Après 30 minutes d'incubation en présence du substrat à l'obscurité et à température ambiante (18-30°C), la présence du conjugué est révélée par un changement de couleur.
- 6) Distribution de la solution d'arrêt.
 - Cette distribution peut être également contrôlée visuellement : La coloration du substrat, rosée (pour les échantillons négatifs) ou bleu (pour les échantillons positifs), disparaît des cupules qui deviennent incolores (pour les échantillons négatifs) ou jaunes (pour les échantillons positifs) après addition de la solution d'arrêt.
- 7) Lecture des densités optiques à 450/620-700 nm et interprétation des résultats.

➤ **Procédure du dosage :**

- On distribue dans les cupules dans l'ordre suivant : cupules A1, B1, C1 et D1 : 100 µl de contrôle négatif (R3), cupule E1: 100 µl de contrôle positif (R4), cupules F1, G1, H1: 100 µl d'échantillons à tester, ensuite on distribue rapidement 50 µl de la solution reconstituée de conjugué (R6 + R7) dans toutes les cupules, puis on homogénéise le mélange réactionnel. Après rajout du conjugué, les cupules contenant des échantillons se colorent en rouge (voir annexe 07) ;
- Puis on recouvre d'un film adhésif et on incube pendant 1 heure et 30 ± 5 minutes à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ notre plaque (9F80-01) de 96 cupules (voir figure), ensuite on retire le film adhésif, on aspire le contenu de chaque cupule et on lave au moins 5 fois (voir annexe 08 et 09) ;
- Ensuite on distribue rapidement dans toutes les cupules 100 µl de la solution de révélation (colorée en rose) de l'activité enzymatique (R8 + R9) préalablement préparée, on laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 ± 5 minutes à température ambiante (18 à 30°C). Lors de cette incubation, on n'utilise pas le film adhésif, puis on ajoute 100 µl de la solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation, on homogénéise le mélange réactionnel ;
- La distribution de la solution d'arrêt, qui est incolore, peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation. La coloration du substrat, rosée (pour les échantillons négatifs) ou bleu (pour les échantillons positifs), disparaît des cupules qui deviennent incolores (pour les échantillons négatifs) ou jaunes (pour les échantillons positifs) après addition de la solution d'arrêt ;
- On essuie soigneusement le dessous des plaques. On attend au moins 4 minutes après la distribution de la solution d'arrêt avant la lecture et dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction, lire la densité optique à 450/620 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (voir annexe 10) ;
- Enfin on s'assure avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

➤ **Calcul et interprétation des résultats :**

 **Calcul de la densité optique moyenne du contrôle négatif : DO R3**

Exemple :

Tableau 04 : Exemple de Calcul de la densité optique moyenne du contrôle négatif « DO R3 ».

Contrôle négatif R3	DO
1	0.030
2	0.031
3	0.032
4	0.027

Total DO R3 = 0,120

Total DO R3 /4 = 0.030 = moyenne DO R3

✚ Calcul de la valeur seuil :

Pour chaque plaque, la valeur seuil est égale à : DO R3 + 0,050.

Exemple :

DO R3 = 0,030

Valeur seuil (VS) = 0,030 + 0,050 = 0,080

Conditions de validation du test :

Toutes les valeurs du contrôle négatif doivent être inférieures ou égales à 0,080 unité de densité optique. La valeur du contrôle positif (DO R4) doit être supérieure ou égale à 1.000. Calcul des ratios :

Pour chaque échantillon, calculer le ratio :

$$\text{Ratio} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{VS}}$$

✚ Interprétation des résultats :

Les échantillons dont le ratio est inférieur à 1 sont considérés négatifs d'après le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA. Les échantillons dont le ratio est compris entre 0,9 et 1 doivent être interprétés avec prudence. Les échantillons dont le ratio est égal ou supérieur à 1 sont considérés comme initialement positifs et doivent être retestés en double avant l'interprétation finale.

Si après répétition de l'essai, pour un échantillon, le ratio des 2 doublets est inférieur à 1, le résultat initial est non reproductible et l'échantillon est déclaré négatif selon le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA.

Pour les échantillons initiaux réactifs ou douteux ($0,9 < \text{ratio} < 1$), après répétition de l'essai, si au moins un ratio des 2 doublets est égal ou supérieur à 1, le résultat initial est reproductible et l'échantillon est déclaré positif selon le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA.

Les échantillons qui ont été retestés en double et trouvés négatifs selon le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA, mais pour lesquels une des valeurs est proche de la valeur seuil (ratio entre 0.9 et 1) devraient être considérés avec prudence.

I.2.4- Test de confirmation :

Le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA Confirmatory est utilisé pour confirmer la présence de l'Ag de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs) dans les échantillons sériques ou plasmatiques humains trouvés réactifs par le test de screening Monolisa™ HBs Ag ULTRA.

Principe de test :

Le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA Confirmatory utilise le principe de la neutralisation par un excès d'anticorps anti-HBs de l'Ag HBs présent dans les échantillons sériques ou plasmatiques. Dans le cas d'un échantillon positif en antigène HBs, les anticorps anti-HBs du réactif de neutralisation saturent les déterminants antigéniques HBs de l'échantillon qui ne pourront plus se lier à l'anticorps immobilisé sur la phase solide. Une réduction de la densité optique sera observée lors de la comparaison avec le même échantillon où le réactif de neutralisation est remplacé par un contrôle diluant négatif ne contenant pas d'anticorps anti- HBs. Plusieurs dilutions de l'échantillon seront éventuellement contrôlées pour prendre en compte les variations de concentration en Ag HBs de l'échantillon.

Description des réactifs :

Tableau 05 : les réactifs de Monolisa™ HBs Ag ULTRA Confirmatory.

Identification de l'étiquetage		Description
RA	Neutralization reagents	Réactif de neutralisation Tampon Tris NaCl (pH 8,0) contenant du sérum de mouton et du sérum humain négatif en antigène HBs, en anticorps anti-VHC et anti-VIH1/2, additionné d'anticorps anti- HBs.
RB	Negative control diluent	Contrôle diluant négatif Tampon Tris NaCl (pH 8,0) contenant du sérum de mouton et du sérum humain négatif en antigène HBs, en anticorps anti-VHC et anti-VIH1/2.
RC	Sample diluent	Diluant échantillon Eau physiologique à 0,85%.

 **Procédure du test :**

On distribue dans les cupules dans l'ordre suivant :

- 100 µl de contrôle négatif (R3) de la trousse Monolisa™ HBs Ag ULTRA en A1, A2,
- 100 µl de contrôle positif (R4) de la trousse Monolisa™ HBs Ag ULTRA en B1, B2,
- 100 µl du premier échantillon à confirmer en C1, C2, D1, D2,
- 100 µl du deuxième échantillon à confirmer en E1, E2, F1, F2,
- 100 µl du troisième échantillon à confirmer en G1, G2, H1, H2
 - On rajoute 20 µl de contrôle diluant négatif (RB) dans les cupules A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1 et 20 µl de réactif de neutralisation (RA) pour les cupules A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2
 - On distribuer 50 µl de la solution de conjugué reconstitué (R6 + R7) dans toutes les cupules.
 - Lecture des densités optiques à 450/620-700 nm et interprétation des résultats.

 **Calcul / Interprétation des résultats**

- **Ratio de réactivité des contrôles et des échantillons**

Pour les contrôles positif (R4) et négatif (R3) de la trousse Monolisa™ HBs Ag ULTRA, calculer :

$$\text{Le ratio de réactivité} = \frac{\text{DO contrôles avec RB}}{[(\text{DO R3 avec RB} + \text{DO R3 avec RA})/2] + 0,050}$$

Pour chaque échantillon, calculer :

$$\text{Le ratio de réactivité} = \frac{\text{Moyenne DO échantillon avec RB}}{[(\text{DO R3 avec RB} + \text{DO R3 avec RA})/2] + 0,050}$$

➤ **Pourcentage d’Inhibition**

On calcule les pourcentages d’inhibition des densités optiques enregistrées pour le contrôle positif (R4) et négatif (R3) traités par le réactif de neutralisation (RA) et le contrôle diluant négatif (RB).

$$\text{Pourcentage d’Inhibition} = \frac{(\text{DO contrôles avec RB}) - (\text{DO contrôles avec RA})}{(\text{DO contrôles avec RB})} \times 100$$

On calcule les pourcentages d’inhibition des densités optiques enregistrées pour les échantillons traités par le réactif de neutralisation (RA) et le contrôle diluant négatif (RB).

$$\text{Pourcentage d’Inhibition} = \frac{(\text{Moyenne DO échantillons avec RB}) - (\text{Moyenne DO échantillons avec RA})}{(\text{Moyenne DO échantillons avec RB})} \times 100$$

➤ **Interprétation des résultats**

Un échantillon sera confirmé positif pour l'Ag HBs si le ratio de réactivité est supérieur ou égal à 0,8 et le pourcentage d’Inhibition est supérieur ou égal à 50%..

Exemple :

**Tableau 06 : Exemple d'interprétation des résultats par le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA
Confirmatory.**

Ratio de réactivité des échantillons	Pourcentage d'Inhibition	Interprétation
$\geq 0,8$	$\geq 50 \%$	Confirmé
$\geq 0,8$	$< 50 \%$	Non confirmé à diluer
$< 0,8$	Quel que soit le résultat	Non réactif*

* Non confirmé pour les échantillons testés en dilution

I.2.5- Analyse statistique

L'étude statistique a été effectuée en utilisant le calcul des moyennes, et des pourcentages des prévalences de la maladie au sein de l'échantillon.

CHAPITRE II :
RÉSULTAS ET
DISCUSSIONS

I. Résultats descriptifs

➤ Répartition de la population d'étude en fonction de l'âge :

La tranche d'âge des moins de 15 ans était la plus représentée dans notre population d'étude avec 21,9% des cas comme on le voit dans la Figure 18.

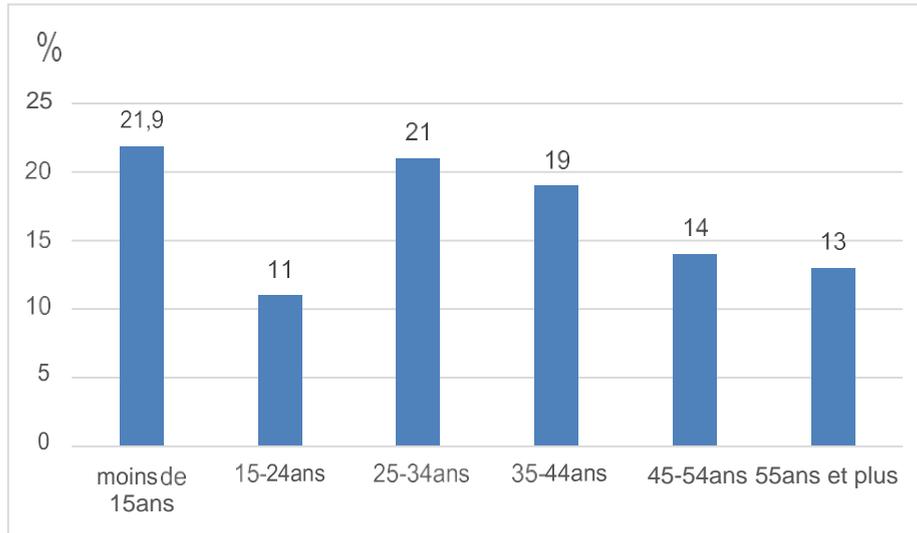


Figure 18 : Répartition de la population d'étude pour l'AgHBs en fonction de l'âge.

➤ Répartition de la population d'étude en fonction du sexe :

La présente étude a porté sur 219 personnes : 88 de sexe masculin et 131 de sexe féminin (figure 19), ayant une moyenne d'âge de 33 ans, au niveau du laboratoire privé d'analyses médicales de Larbaa, wilaya de Blida du 06 mai au 06 juin 2018.

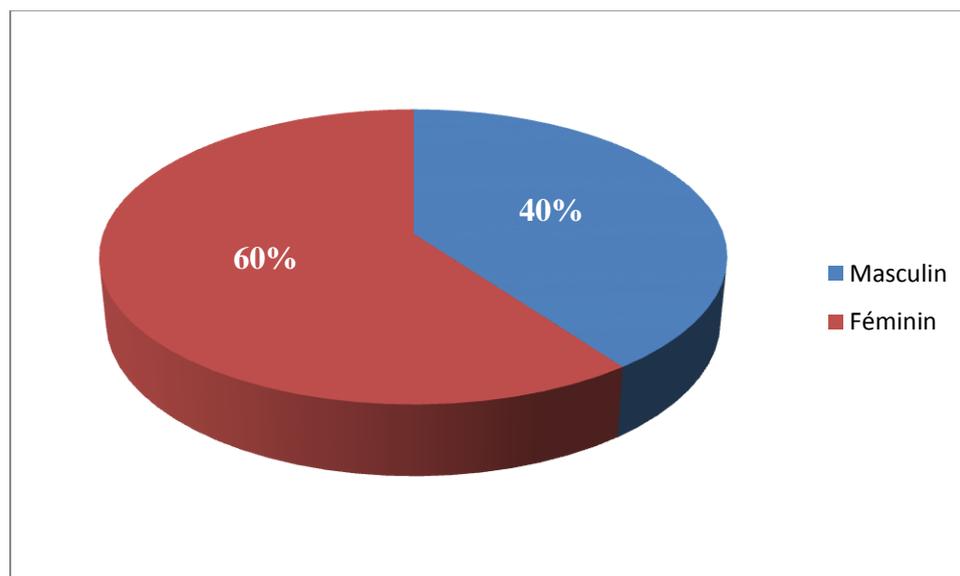


Figure 19 : Répartition de la population d'étude pour l'AgHBs en fonction du sexe.

Des prélèvements sanguins ont été effectués chez ces personnes, pour être dépistés, pour le virus d'hépatite B. 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.

➤ **Répartition de la population d'étude en fonction de la profession :**

La prévalence de la maladie en fonction de la profession était majoritairement représentée par la catégorie « sans Emploi » avec 33,3% (voir figure 20).

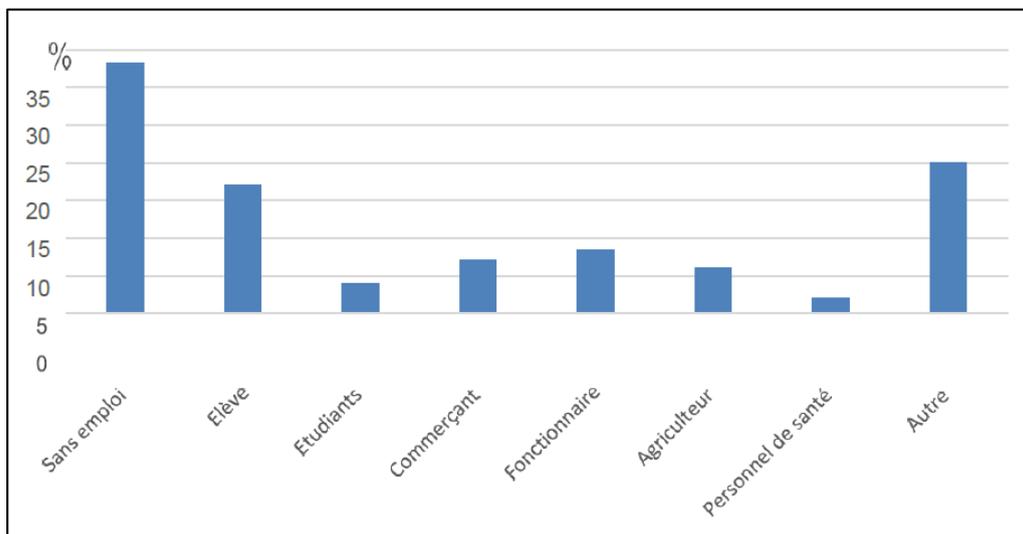


Figure 20 : Répartition des patients en fonction de la profession.

➤ **Statut matrimonial des patients :**

La majorité de nos patients était mariée avec un taux de 65,8%.

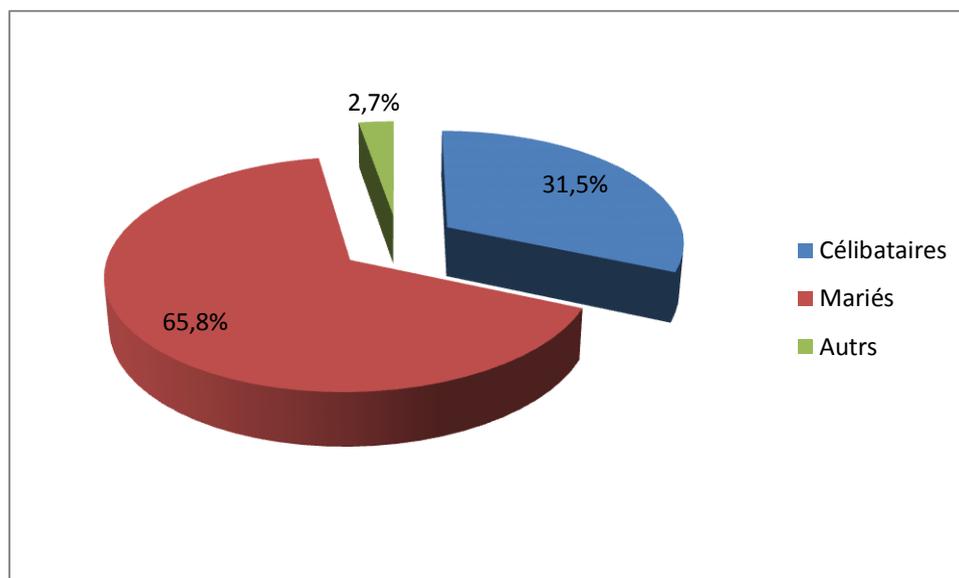


Figure 21 : Répartition des patients en fonction du statut matrimonial

II. Résultats analytique

➤ **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), La technique ELISA utilisée a été faite par : La trousse de Monolisa™ HBs Ag ULTRA, qui est d'une grande sensibilité et d'une grande spécificité. Les échantillons dont le ratio est inférieur à 1 sont considérés négatifs d'après le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA. Les échantillons dont le ratio est compris entre 0,9 et 1 doivent être interprétés avec prudence. Les échantillons dont le ratio est égal ou supérieur à 1 sont considérés comme initialement positifs et doivent être retestés en double en utilisant le prélèvement d'origine avant l'interprétation finale. 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.

➤ **Test de confirmation :**

Afin d'éliminer d'éventuels faux positifs pour l'Ag HBs, les 45 sérums trouvés positifs au premier test subissent un test de confirmation par la trousse de Monolisa™ HBs Ag ULTRA confirmatory, dont le fonctionnement est basé sur l'utilisation d'un AC spécifique de neutralisation des échantillons trouvés réactifs par le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA. Les résultats trouvés lors du dépistage de l'AgHBs et lors du test de confirmation sont présenté dans le tableau (voir annexe 11).

Parmi les 45 personnes dépistées, 40 sont trouvées positifs pour 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 219 personnes dépistées, 40 sont trouvés positifs pour l'Ag HBs (19 hommes et 21 femmes), soit une prévalence générale de l'hépatite B de 18.3 %, avec un sex-ratio F/H de 1.49.

Les résultats trouvés sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Prévalence générale de l'AgHBs chez les sujets dépistés.

	Effectif	Positif	Négatif	Prévalence
Homme	88	19	69	21.6 %
Femme	131	21	110	16 %
Total	219	40	179	18.3 %

➤ **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

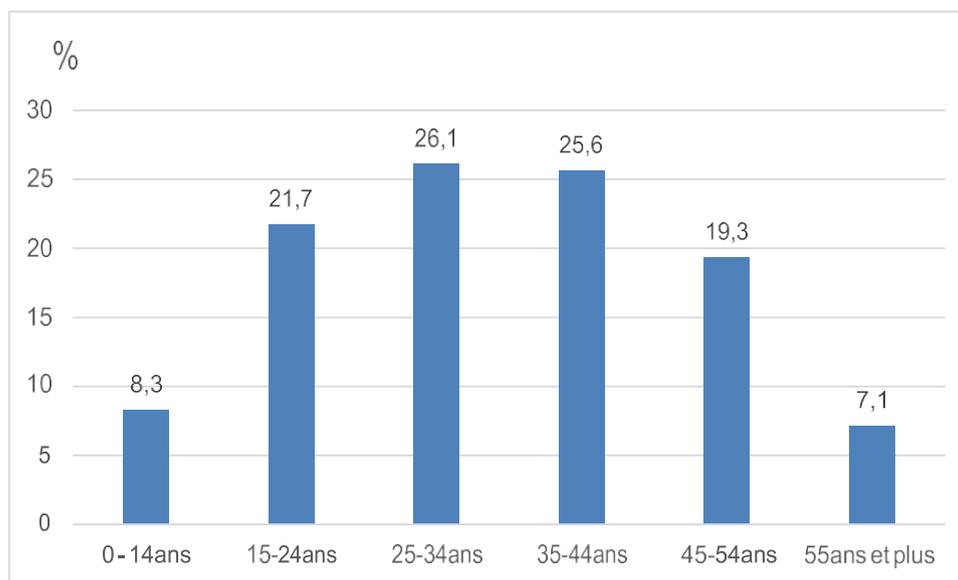


Figure 22 : Répartition des patients atteints de l'AgHBs en fonction des classes d'âge.

L'analyse de cet histogramme montre que la répartition de la prévalence de l'AgHBs chez la population dépistée, est hétérogène selon les six tranches d'âges étudiées. Nous avons constaté une séroprévalence de l'AgHBs élevée dans toutes les tranches d'âge. La tranche d'âge 25-34 ans était la plus touchée avec 26,1% suivi de la tranche 35-44 ans avec 25,6%. Ce résultat concorde avec celui de l'étude faite en France à l'Institut de veille sanitaire (**Antona, D.2010**).

Dans notre étude, nous avons observé que le portage de l'AgHBs était plus fréquent chez les adultes que chez les enfants. L'augmentation est plus remarquable dans le groupe de 15 à 24 ans, peut être en raison de manque d'hygiène et sanitaire. Les faibles prévalences du portage de l'AgHBs chez les enfants seraient en partie expliquées par l'introduction du vaccin contre le virus de l'hépatite B dès leur jeune âge selon le programme de l'OMS, et l'absence de la transmission sexuelle chez cette population. Pour la tranche d'âge >50ans la prévalence était 7.1 %, ce résultat montre une diminution de la prévalence du VHB chez les personnes âgées. La prévalence du VHB chez les 219 personnes dépistées est, donc, de 18.3 % avec des extrêmes allant de 8.3 % à 26.1 % selon les tranches d'âge étudiées.

➤ **Prévalence de l'AgHBs en fonction du sexe :**

Sur les 219 personnes dépistées dans la présente étude, il y a plus de femmes (59.81 %) que de hommes (40.18 %). les résultats du dépistage du VHB montrent que la séroprévalence de l'AgHBs était plus faible chez les patients du sexe féminin (16%) comparés aux patients du sexe masculin (21,6%). La forte prévalence chez les hommes par rapport aux femmes a été décrite en France par (Antona, D. 2010) (voir Figure 23).

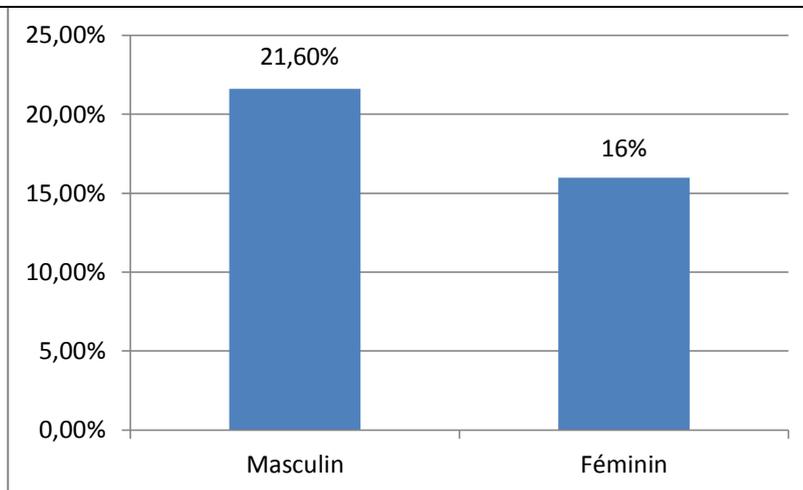


Figure 23 : prévalence de l'Ag HBs selon le sexe.

➤ **Prévalence de la maladie AgHBs en fonction de la profession des patients :**

La prévalence du portage de l'AgHBs dans notre étude était variable selon les couches socioprofessionnelles. Les taux les plus élevés ont été observés chez les étudiants (30%) les agriculteurs (28,6%) et le personnel de santé (25%). Ces résultats sont à prendre avec prudence car ces professions étaient peu représentées dans notre étude. La séroprévalence était faible chez les élèves (11 %), ceci pourrait s'expliquer par le fait que, la majorité de ce groupe a bénéficié de la vaccination contre le VHB (voir figure 24).

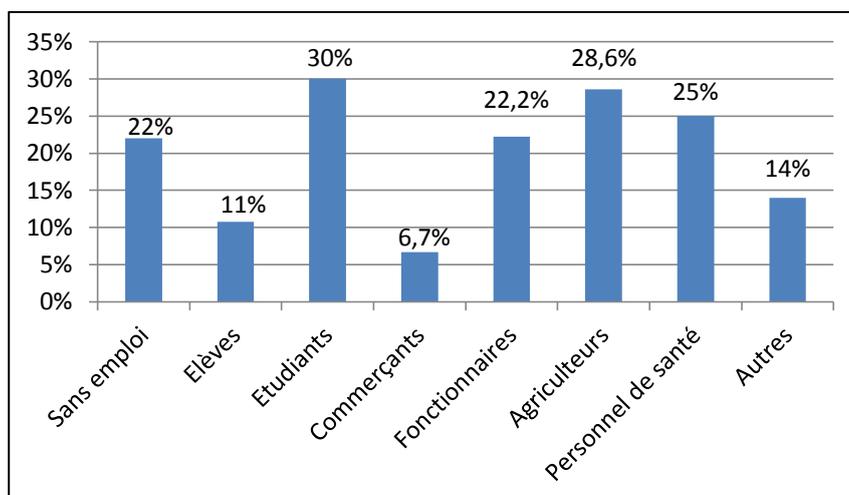


Figure 24 : les personnes atteintes d'AgHBs en fonction de la profession.

➤ **Prévalence des AgHBs en fonction du statut matrimonial :**

Les mariés et les célibataires sont tous infectés par le virus de l'hépatite B avec un taux de portage respectivement de 20,80 % et 13,33%. Il n'y a pas de différence statistiquement significative liée à la comparaison entre le statut matrimonial et le portage de l'AgHBs (voir figure 25).

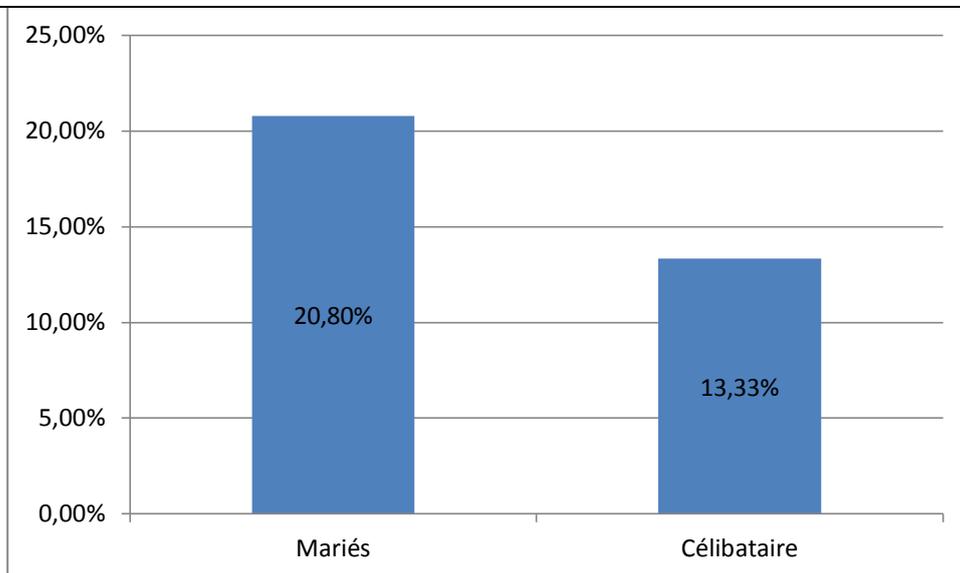


Figure 25 : Prévalence de l' AgHBs en fonction du statu matrimonial.

CHAPITRE III :

CONCLUSION

Conclusion

À travers ce modeste travail, nous concluons que notre étude sur le dépistage des AgHBs du virus d'hépatite B par la technique d'enzyme-linked immunosorbent assay a permis d'estimer le niveau d'infection à VHB chez 219 personnes dépistées (88 hommes et 119 femmes), nous avons trouvé que le virus d'hépatite B touche beaucoup plus les hommes que les femmes avec un taux de portage respectivement de 21.6 % et 16 %, ainsi nous avons constaté une séroprévalence de l'AgHBs élevée dans toutes les tranches d'âge. La tranche d'âge 25-34 ans était la plus touchée avec 26,1% suivi de la tranche 35-44 ans avec 25,6%. Pour ce qui est des patients porteurs d'antigènes HBs en fonction de la profession, nous avons remarqué que les taux les plus élevés ont été observés chez les étudiants (30%) les agriculteurs (28,6%) et le personnel de santé (25%), par contre la séroprévalence était faible chez les élèves (11 %), ceci pourrait s'expliquer par le fait que, la majorité de ce groupe a bénéficié de la vaccination contre le VHB. En ce qui concerne la prévalence de l'AgHBs en fonction du statut matrimonial, nous avons remarqué que Les mariés et les célibataires sont tous infectés par le virus de l'hépatite B avec un taux de portage respectivement de 20,80 % et 13,33%.

Cette étude est d'importance pour la détermination des porteurs chroniques du virus d'hépatite B 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. Ainsi le dépistage des AgHBs du virus d'hépatite B par la technique enzyme-linked immunosorbent assay, a permis 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.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- **ANTONA, D et LARSEN, C.** Épidémiologie de l'hépatite B en France. *Virologie*, 2010, vol. 14, no 1, p. 23-34.
- **BACO, E.** Synthèse d'haptènes de phycotoxines pour l'élaboration d'un immunocapteur. 2011. Thèse de doctorat. Bordeaux 1.
- **BEKONDI, C.** Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à virus de l'hépatite B en République Centrafricaine. 2008. Thèse de doctorat. Nancy 1.
- **BOUVENOT, G et CAULIN, C.** Guide du bon usage du médicament. Lavoisier, 2011.
- **DENIS, F.** Les virus transmissibles de la mère à l'enfant. John Libbey Eurotext, 1999.
- **DUDA, A.** du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES de BIOLOGIE MEDICALE. 2015.
- **EVEN, K.** Développement d'outils innovants pour le diagnostic et la découverte de cibles dans le cancer du sein. 2012. Thèse de doctorat. Aix-Marseille.
- **FOURNIER, M.** Implication du gène core dans l'accumulation de l'ADN circulaire clos de façon covalente du virus de l'hépatite B. 2014. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I.
- **GELDERBLOM, H R.** Structure et classification des virus. 1996.
- **LE FAOU, A.** Virologie humaine. Pradel, 2012.
- **LIANG, T. J.** Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*, 2009, vol. 49, no S5.
- **LOCATELLI, et TESTONI, B.** Analyse des événements virologiques intrahépatiques d'une infection chronique par le virus de l'hépatite B. *médecine/sciences*, 2017, vol. 33, no 1, p. 92-95.
- **LOURENÇO, E V et ROQUE-BARREIRA, M-C.** Immunoenzymatic quantitative analysis of antigens expressed on the cell surface (cell-ELISA). In: *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Humana Press, 2010. p. 301-309.
- **MALLEM, L.** Indication thérapeutique aux différents stades évolutifs des porteurs chroniques du virus d'hépatite B. thèse de doctorat : sciences médicales. Oran : Faculté de médecine, 2015, 202 pages.

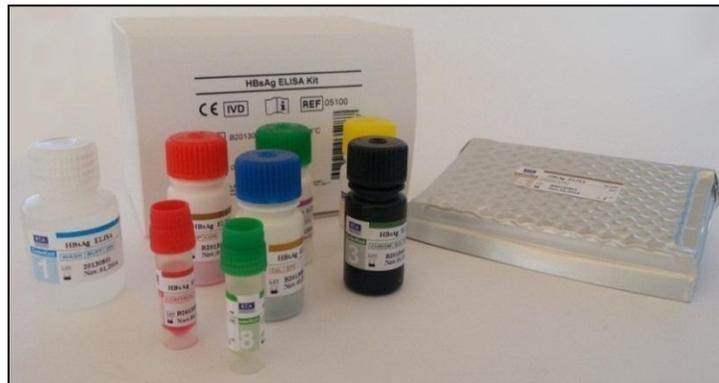
- **MICHEL, M-L.** Vaccination contre l'hépatite B-Succès et perspectives. médecine/sciences, 2016, vol. 32, no 8-9, p. 739-745.
- **PASQUIER, C, GROSJEAN, J, CLAVÉ, D, et al.** Bactériologie et virologie pratique. De Boeck Supérieur, 2017.
- **SBAI, A.** Epidémiologie, génotype et facteurs de risque de l'hépatite virale B au Maroc. 2012.
- **SCHAECHTER, M, MEDOFF, G, et EISENSTEIN, B I.** Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck Supérieur, 1999.
- **TREMBLAY, M P.** Nouveau rôle oncogénique pour les virus de l'hépatite B et C: l'altération des événements d'épissage alternatif. 2016.
- **WAGNER, A., DENIS, F., RANGER-ROGEZ, S., et al.** Génotypes du virus de l'hépatite B. Immuno-analyse & Biologie spécialisée, 2004, vol. 19, no 6, p. 330-342.
- **WENSIERSKI, S.** Mise au point d'un dosage des chaînes légères canines par la méthode de l'ELISA sandwich et applications cliniques. 2010. Thèse de doctorat.
- **ZHANG, Xiaonan, LU, Wei, ZHENG, Ye, et al.** In situ analysis of intrahepatic virological events in chronic hepatitis B virus infection. The Journal of clinical investigation, 2016, vol. 126, no 3, p. 1079-1092.
- **ZOULIM, F. et TRÉPO, C.** Virus de l'hépatite B: réplication et mécanismes d'action des antiviraux. Virologie, 1997, vol. 1, no 3, p. 197-215.

ANNEXES



Les plasmas des patients.

Annexe 01 : Matériel biologique.



La trousse de Monolisa™ HBs Ag ULTRA.



Micropipettes.



La centrifugeuse.



Incubateur de la chaîne ELISA.



Laveur de la chaîne ELISA.

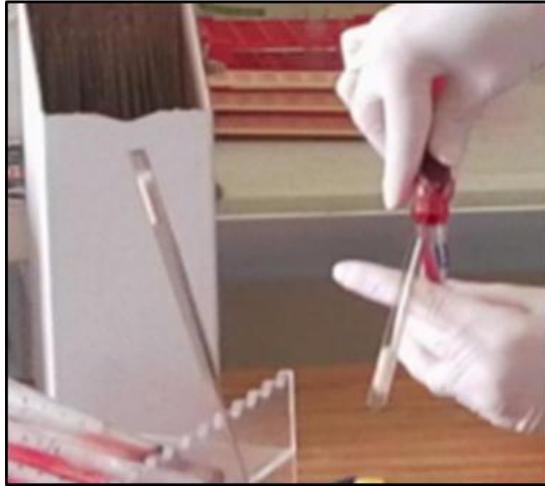


Spectrophotomètre de la chaîne ELISA.

Annexe 02 : Matériel non biologique.



Annexe 03 : La coagulation pour la séparation du caillot de sang du plasma.



Annexe 04 : La séparation du plasma et des caillots de sang.



Annexe 05 : L'accueil du sérum à l'aide d'une micropipette.



Annexe 06 : Identification des échantillons avant manipulation.



Annexe 07 : Ajout des sérums et le conjugué.



Annexe 08 : Incubation de la microplaque.



Annexe 09 : Lavage des solutions de la microplaque.



Annexe 10 : Lecture de la densité optique au spectrophotomètre.

Annexe 11 : Tableau présente les résultats de dépistage de l'AgHBs et du test de confirmation

Test	Valeurs de DO avec RA	Valeurs de DO avec RB	Ratio de réactivité avec des échantillons	Pourcentage d'Inhibition	Interprétation
Contrôle positif (R4)	0,095	2,025	32,66	95%	Confirmé

Contrôle négatif (R3)	0,011	0,013	0,21	15%	Non réactif
Echantillon 1	0,049 0,045	2,079 2,058	33.36	98%	Positif
Echantillon 2	0,039 0,024	2,069 2,045	33.17	98.47%	Positif
Echantillon 3	0,044 0,039	2,055 2,036	33.18	98.47%	Positif
Echantillon 4	0,066 0,051	2,011 2,003	32.37	97.09%	Positif
Echantillon 5	0,078 0,065	2,088 2,073	33.56	96.56%	Positif
Echantillon 6	0,070 0,056	2,069 2,037	33.11	96.93%	Positif
Echantillon 7	0,030 0,026	2,034 2,017	32.66	97.20%	Positif
Echantillon 8	0,051 0,046	2,049 2,038	32.96	97.62%	Positif
Echantillon 9	0,086 0,075	2,032 2,017	32.65	96.02%	Positif
Echantillon 10	0,030 0,024	2,066 2,029	33.02	98.68%	Positif
Echantillon 11	0,045 0,044	2,075 2,057	33.32	98.85%	Positif
Echantillon 12	0,050 0,049	2,076 2,054	33.30	97.60%	Positif
Echantillon 13	0,048 0,046	2,087 2,060	33.44	97.73%	Positif
Echantillon 14	0,009 0,007	0,028 0,026	0.44	70.37%	Négatif
Echantillon 15	0,011 0,009	0,020 0,013	0.27	39.39%	Négatif

Echantillon 16	0,049 0,048	2,081 2,062	33.41	95.32%	Positif
Echantillon 17	0,050 0,046	2,077 2,056	33.33	97.68%	Positif
Echantillon 18	0,050 0,049	2,082 2,058	33.39	97.61%	Positif
Echantillon 19	0,048 0,044	2,079 2,061	33.39	97.78%	Positif
Echantillon 20	0,047 0,043	2,078 2,061	33.38	95.65%	Positif
Echantillon 21	0,046 0,042	2,082 2,059	33.40	97.88%	Positif
Echantillon 22	0,048 0,043	2,079 2,058	33.36	97.80%	Positif
Echantillon 23	0,050 0,049	2,079 2,058	33.36	97.60%	Positif
Echantillon 24	0,050 0,048	2,079 2,058	33.36	95.26%	Positif
Echantillon 25	0,008 0,005	0,025 0,020	0.36	71.11%	Négatif
Echantillon 26	0,046 0,045	2,078 2,058	33.35	97.80%	Positif
Echantillon 27	0,047 0,046	2,076 2,053	33.35	97.75%	Positif
Echantillon 28	0,050 0,047	2,074 2,055	33.30	97.65%	Positif
Echantillon 29	0,050 0,047	2,079 2,058	33.36	97.66%	Positif
Echantillon 30	0,009 0,008	0,028 0,024	0.42	67.30%	Négatif
Echantillon 31	0,050 0,049	2,077 2,057	33.39	97.61%	Positif

Annexes

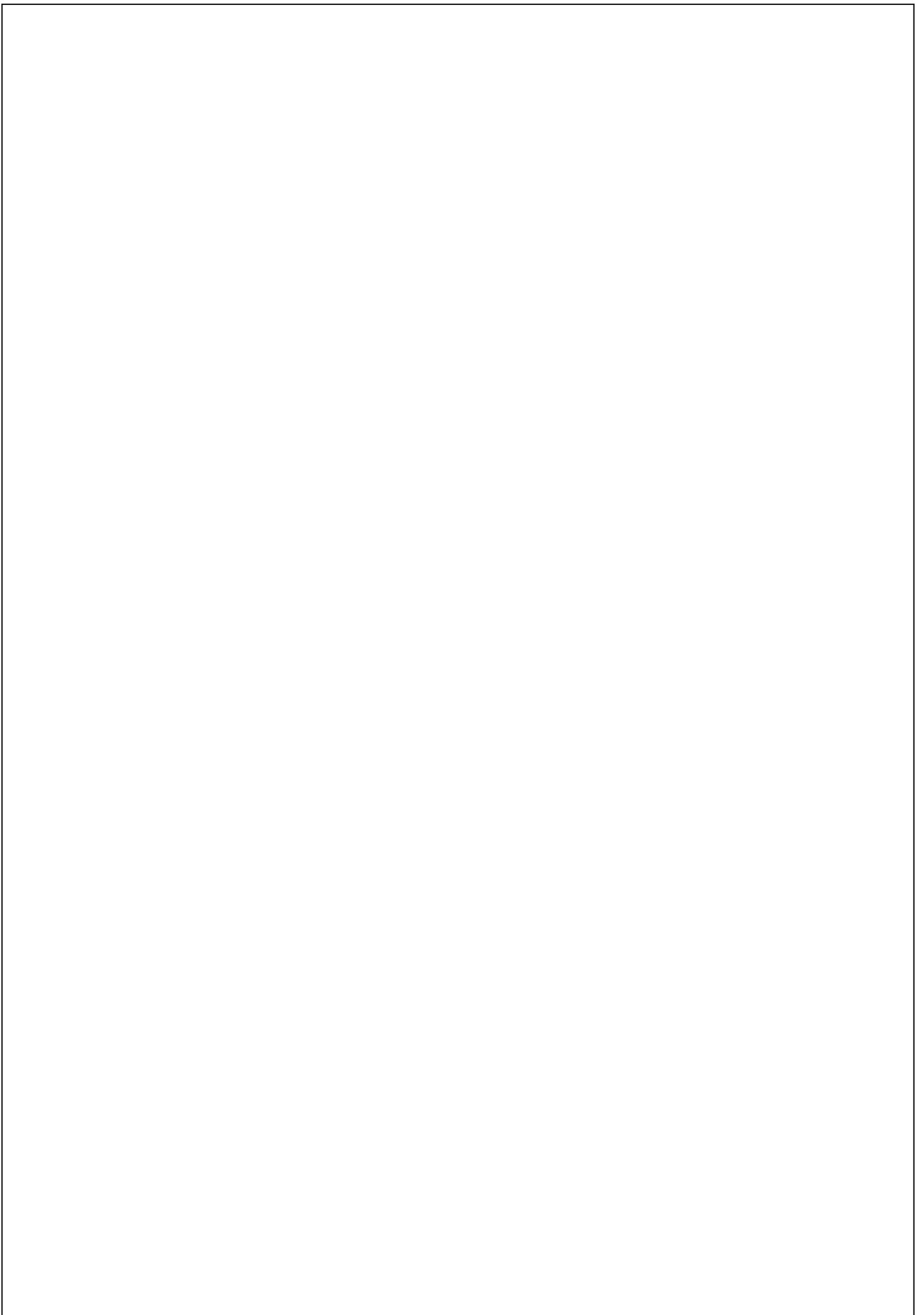
Echantillon 32	0,048 0,045	2,078 2,056	33.34	97.75%	Positif
Echantillon 33	0,047 0,045	2,079 2,059	33.37	97.78%	Positif
Echantillon 34	0,050 0,049	2,079 2,059	33.37	97.60%	Positif
Echantillon 35	0,046 0,045	2,081 2,059	33.39	97.80%	Positif
Echantillon 36	0,049 0,046	2,078 2,063	33.40	97.71%	Positif
Echantillon 37	0,049 0,045	2,077 2,058	33.35	97.73%	Positif
Echantillon 38	0,009 0,006	0,026 0,020	0.37	67.39%	Négatif
Echantillon 39	0,050 0,046	2,076 2,055	33.31	97.68%	Positif
Echantillon 40	0,048 0,045	2,073 2,052	33.27	97.75%	Positif
Echantillon 41	0,048 0,043	2,074 2,054	33.29	97.80%	Positif
Echantillon 42	0,048 0,046	2,075 2,053	33.29	97.72%	Positif
Echantillon 43	0,050 0,049	2,077 2,051	33.29	97.60%	Positif
Echantillon 44	0,049 0,045	2,079 2,050	33.30	97.72%	Positif
Echantillon 45	0,049 0,046	2,078 2,051	33.30	97.70%	Positif

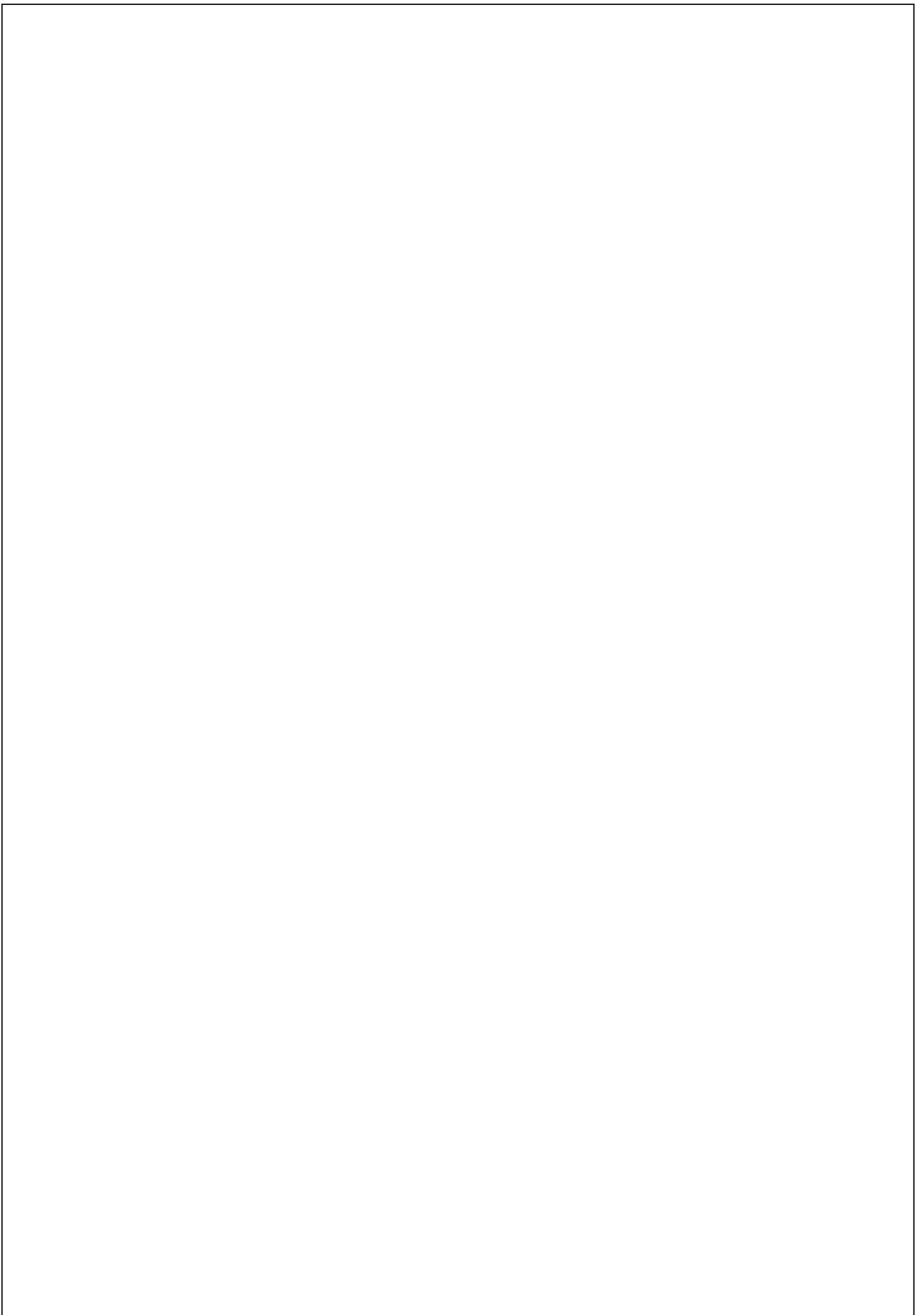
Annexes

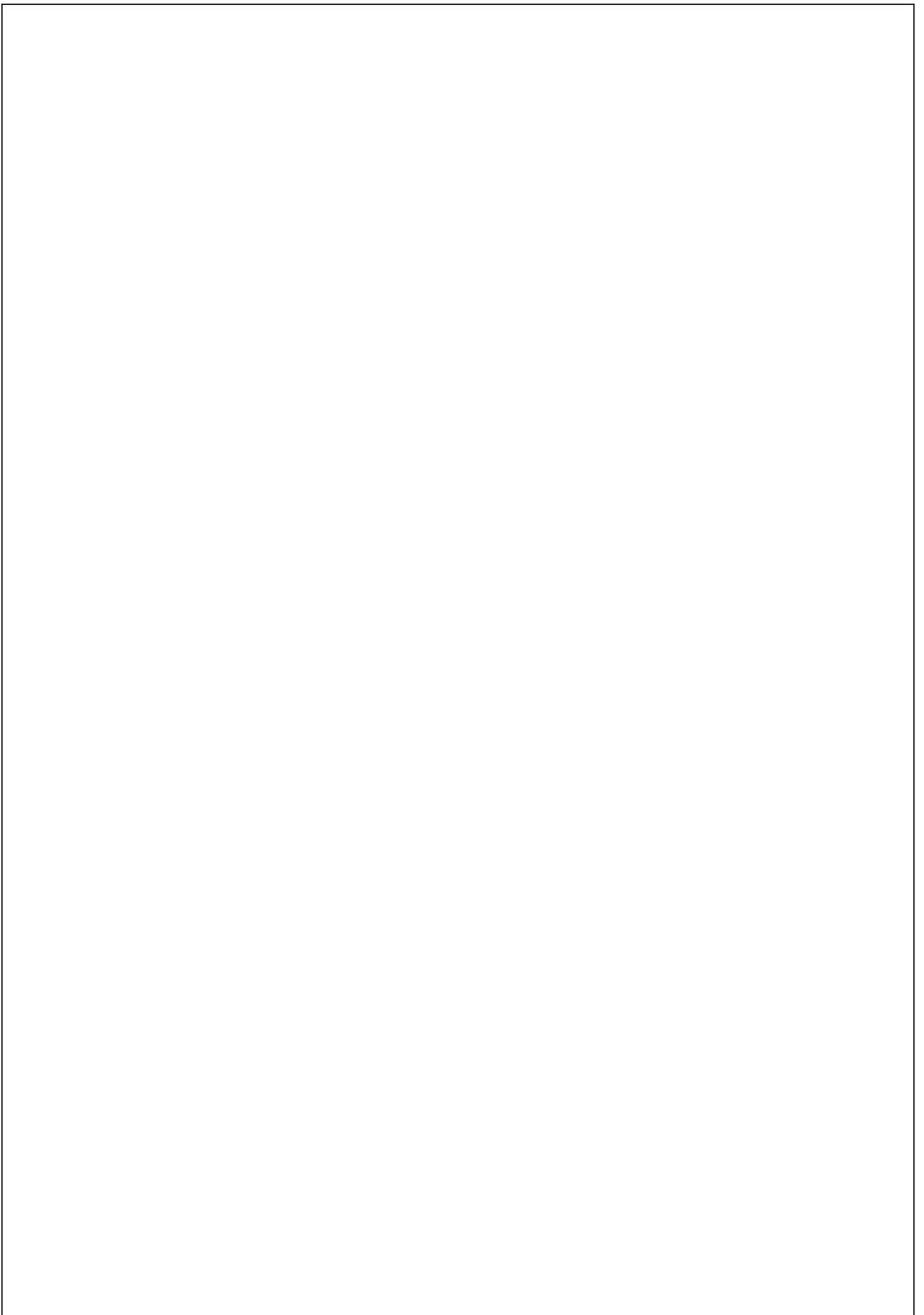
Annexes

Annexes

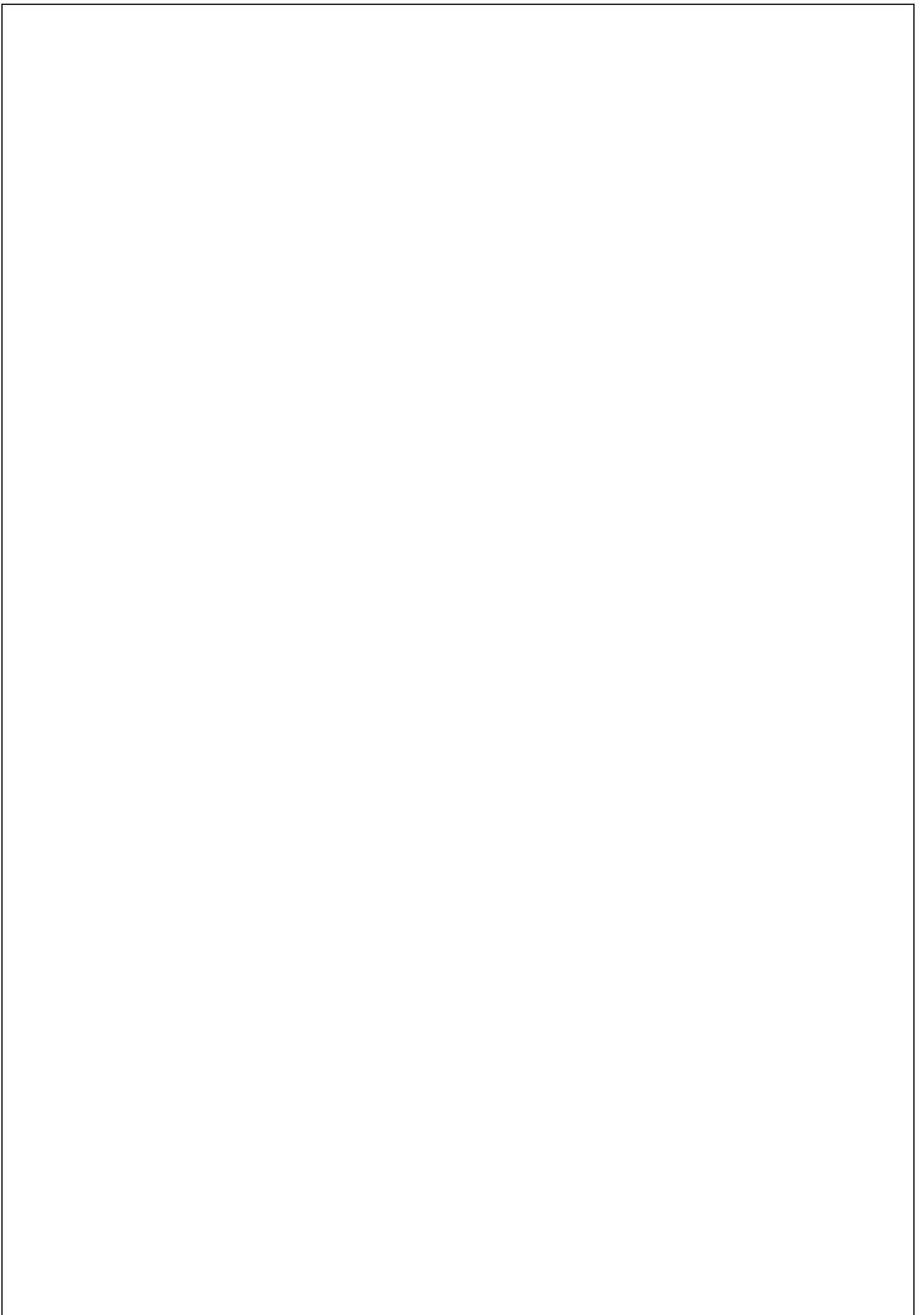
Annexes

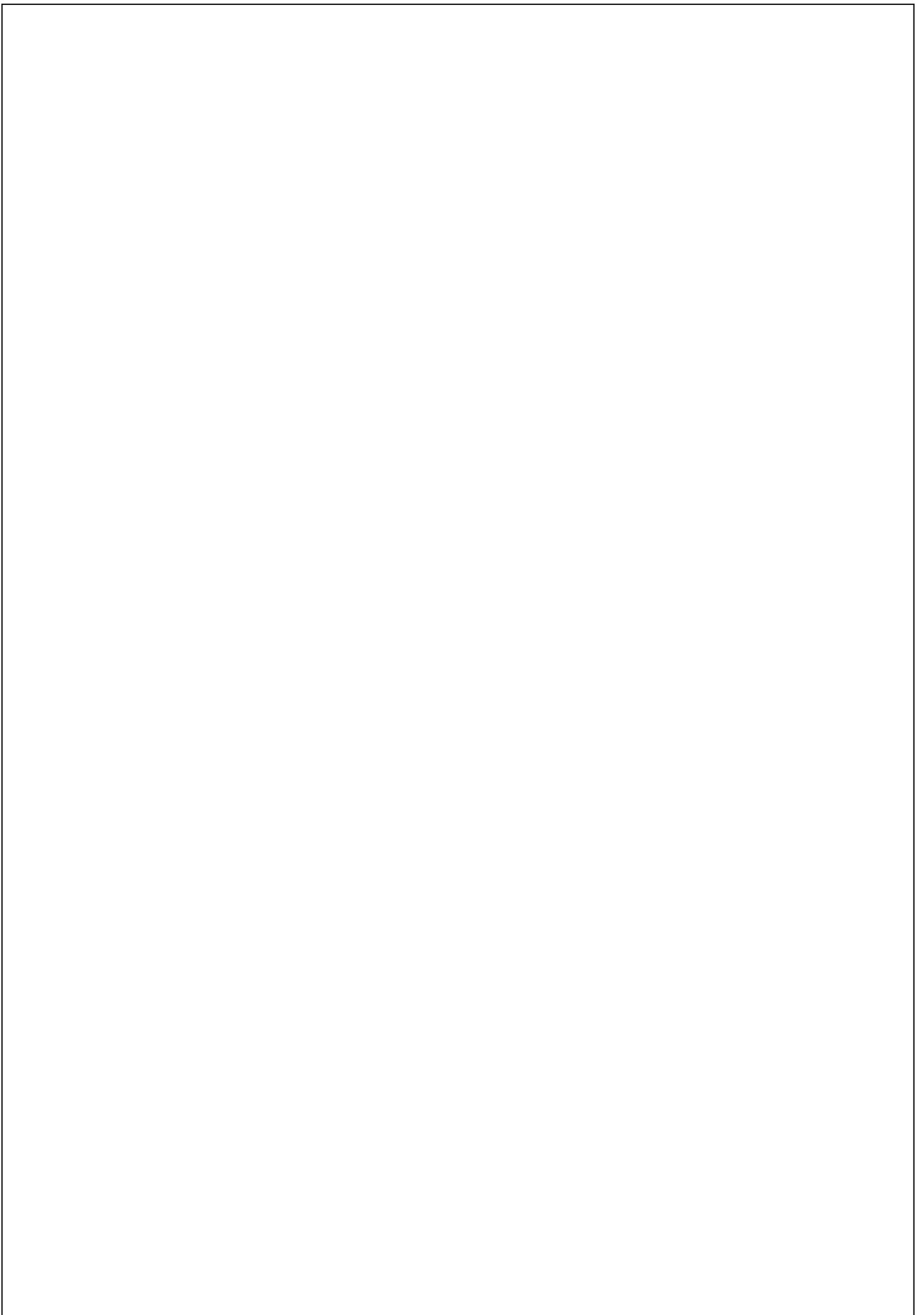


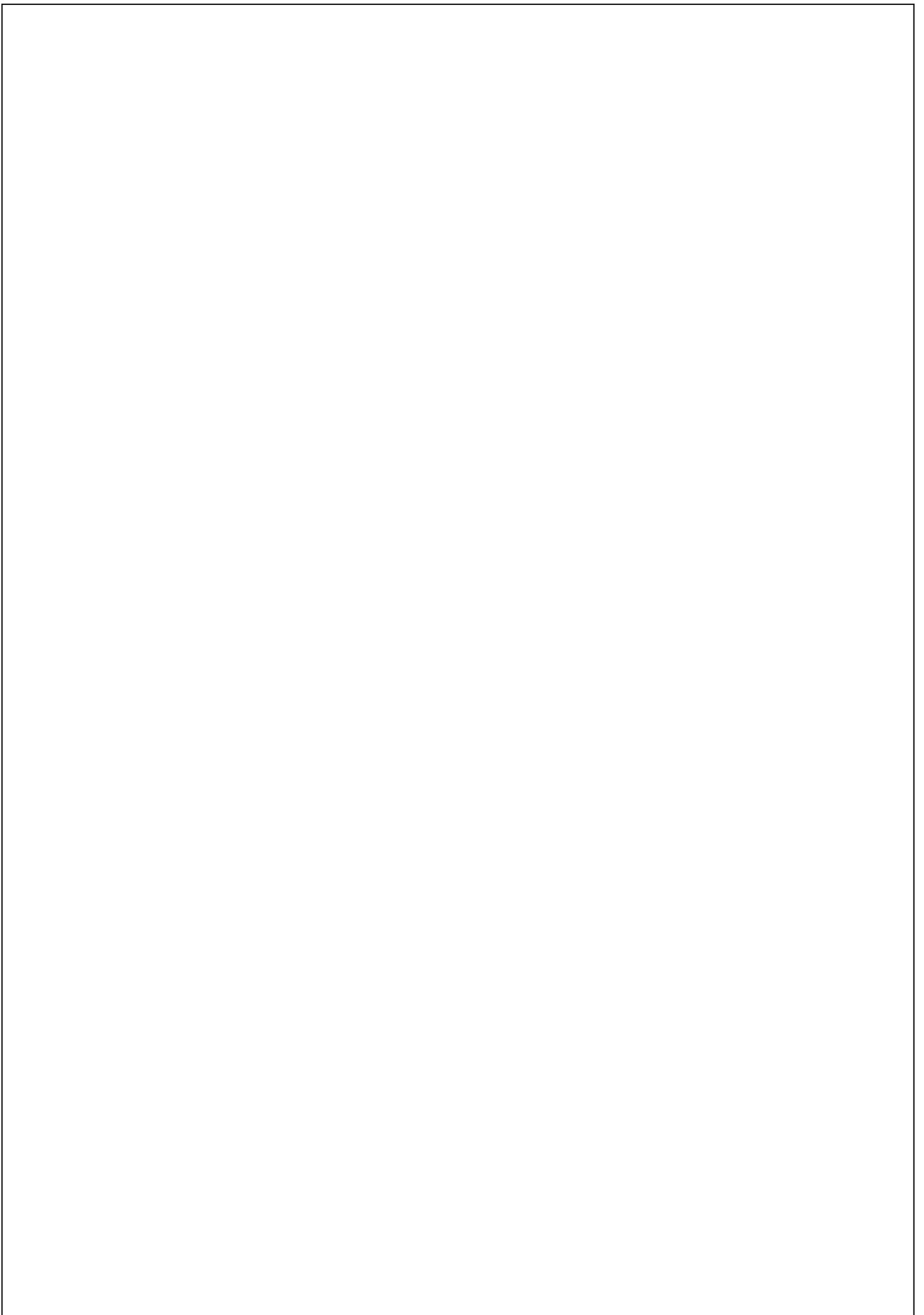


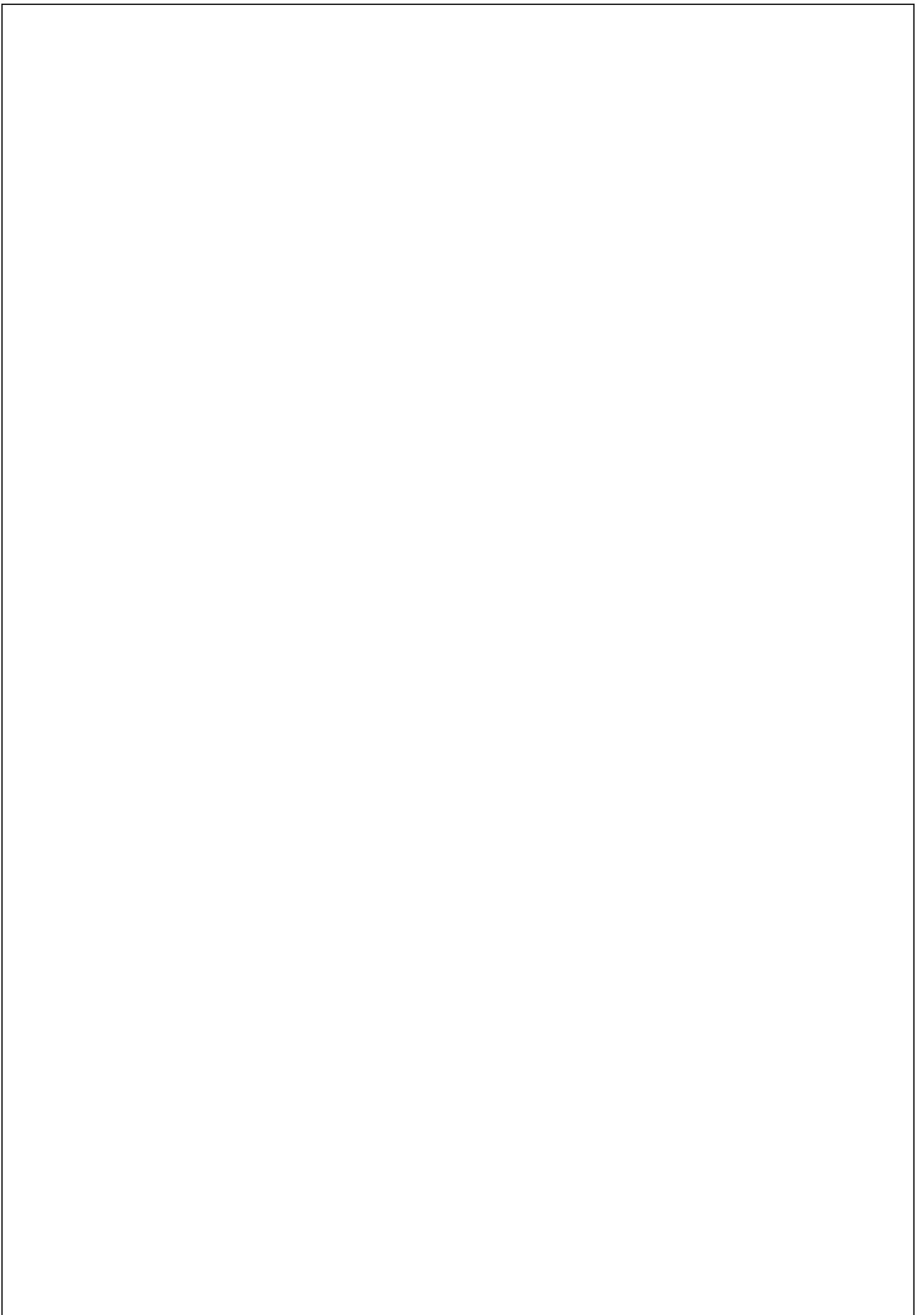


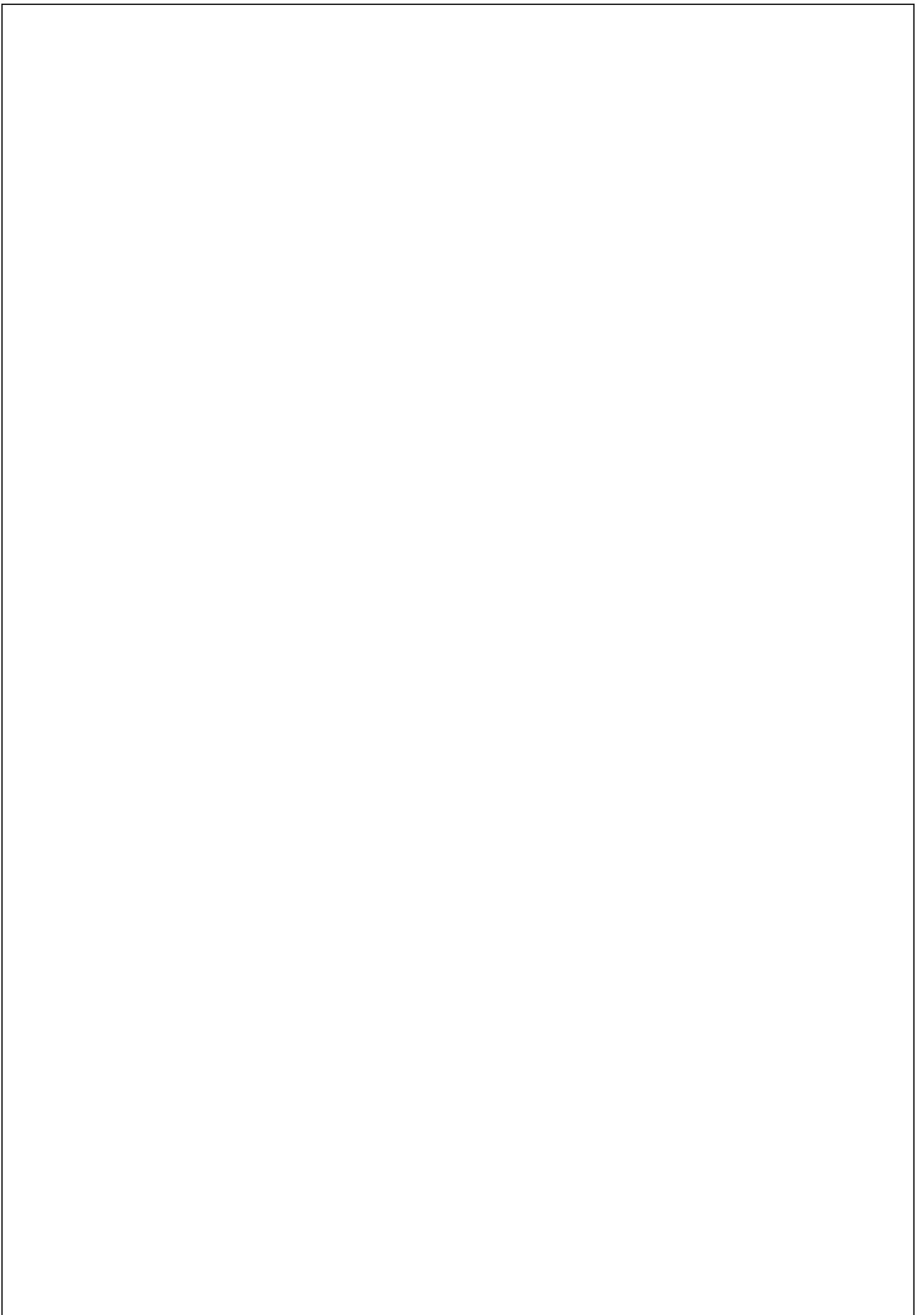
:

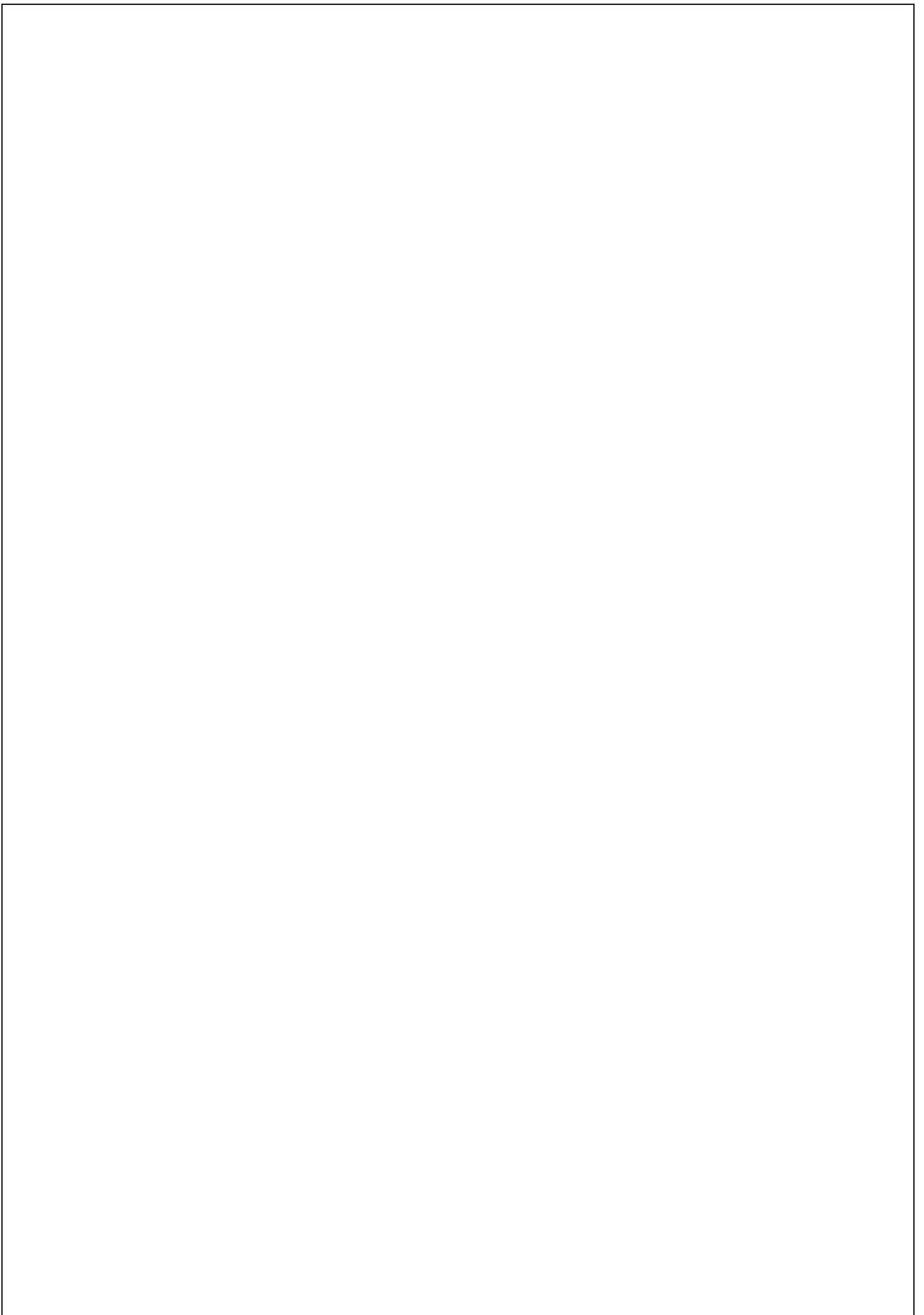


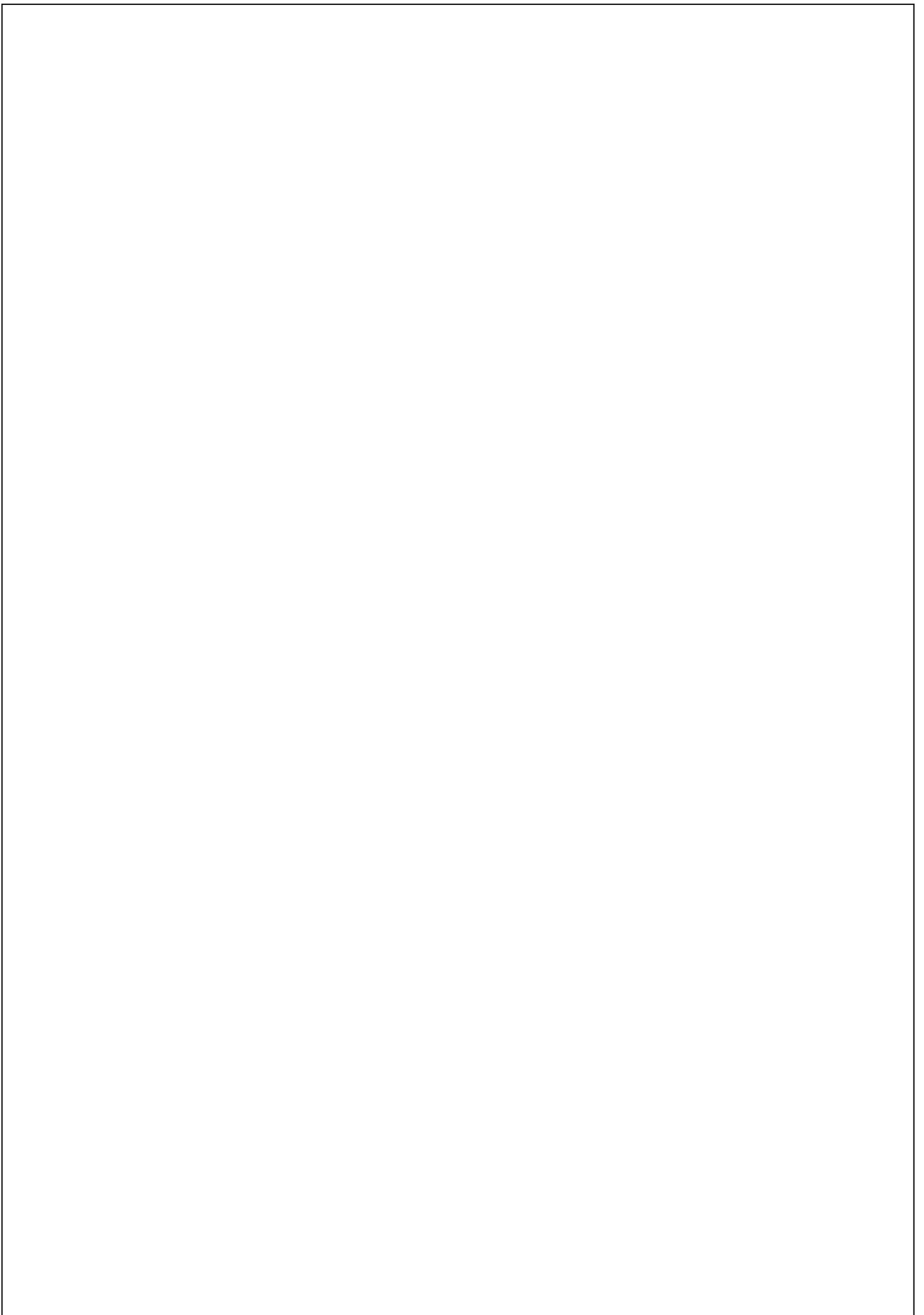












Annexes