

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPEREUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master II en science de la nature et de la vie

Option : Génétique et physiologie

Thème



**Recherche du virus de l'hépatite Delta chez les porteurs
chronique du virus de l'hépatite B**

Réalisé par : M^{elle} KAIS Chahrazed

Soutenu le : 21 / 09 / 2016

Devant le jury composé de :

- | | | | |
|---------------------------------|-----|--------------------|---------------|
| • M ^r BENYAHIA N. | MAA | Université Blida 1 | Président |
| • M ^{me} AISSANI R. | MAA | Université Blida 1 | Examinatrice |
| • M ^{me} BENSALAM A. | MAA | Université d'Alger | Promotrice |
| • M ^{me} CHERRALLAH A. | MCB | Université Blida 1 | Co-promotrice |

Promotion : 2015-2016

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier Dieu tout puissant, de m'avoir guidé sur le chemin du savoir, et de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Au premier lieu, je tiens à remercier ma promotrice *M^{me} BENSALÉM, A.* de m'avoir proposé ce thème, et d'avoir eu la gentillesse et la patience, de mettre à ma disposition toutes ses connaissances, son savoir faire, ainsi que tous les moyens nécessaires pour effectuer mon stage dans les meilleures conditions.

J'exprime mes sincères remerciements à ma co-promotrice *M^{me} CHERRALLAH, A.* d'avoir accepté gentiment d'encadrer ce travail, pour le temps et l'effort qu'elle a consacrés pour réaliser ce travail, pour sa patience, ses encouragements, et de m'avoir prodigué de judicieux conseils.

J'exprime ma profonde gratitude à *M^r BENYAHIA* de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie vivement *M^{me} AISSANI* de bien vouloir accepter d'examiner ce modeste travail.

Mes plus vifs remerciements vont aussi :

À *Mr BESSAAD* ainsi qu'à l'équipe du laboratoire des Virus des Hépatites de l'institut Pasteur de Sidi-Fredj qui m'ont fait profiter de leur expérience, en particulier : *M^{me} HIHI, N. M^{me} BENCHERIFA, N. M^{me} SELMANI, K. M^{me} MOSTEFAOUI, F. M^r KERIOUI, C. M^r ALI CHERIF, T. M^{me} SOLTANI, M. M^{me} AOUIZERT, G.* Pour leur collaboration, et pour leur accueil.

Des remerciements particuliers vont également à mon oncle *M^r KAIS M.*

Et mon frangin *M^r KAIS H.* pour toute l'aide qu'ils m'ont fournie.

Et enfin un grand merci à l'ensemble des enseignants du département de Biologie et physiologie cellulaire qui ont contribué à notre formation durant nos années d'études, et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail en signe de respect et de reconnaissance :

À mes très chers parents, qui ont toujours été à mes côtés, qui m'ont soutenu et encouragé. Sans leur amour, leur compréhension, leurs conseils et leur tolérance je n'aurai jamais pu atteindre mes objectifs.

À ma très chère grand-mère « Messaouda ».

À mon grand-père « Mohamed ».

À mes très chers frères : Hichem et Djamel Eddine.

À mes très chères sœurs : Karima, Manel et Amina.

À mes oncles et leurs épouses, mes tantes et leurs époux.

À tous mes cousins et toutes mes cousines.

À toute la famille KAIS et HADEF.

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

À tous mes amis de la promotion Génétique et physiologie.

À tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université.

Sommaire

Introduction	1
<i>Chapitre I : Recherche bibliographique</i>	
I.1. Historique sur les hépatites B et D	2
I.1.1- Découverte du virus de l'hépatite B	2
I.1.2- Découverte du virus de l'hépatite D	2
I.2. Caractéristiques des virus de l'hépatite B et D	3
I.2.1- Caractéristiques du virus de l'hépatite B	3
I.2.1.1- Classification taxonomique	3
I.2.1.2- Structure	3
I.2.1.3- Organisation génétique	4
I.2.1.4- Géotypes et leur répartition géographique	5
I.2.1.5- Protéines virales	5
I.2.2- Cycle de réplication du virus de l'hépatite B	7
I.2.3- Variabilité génétique du virus de l'hépatite B	7
I.2.4- Caractéristiques du virus de l'hépatite D	8
I.2.4.1- Structure	8
I.2.4.2- Organisation génétique	9
I.2.4.3- Géotype et leur répartition géographique	9
I.2.4.4- Protéines virales	9
I.2.5- Cycle de réplication du virus de l'hépatite D	10
I.3. Pathologie de l'hépatite B et D	11
I.3.1- Pathologie de l'hépatite B	11
I.3.1.1- Epidémiologie et mode de transmission	11
I.3.1.2- Signes cliniques	11
I.3.1.3- Diagnostic	12
I.3.1.4- Traitement	12
I.3.1.5- Pathogenèse	12

I.3.2- Pathologie de l'hépatite D	13
I.3.2.1- Epidémiologie et mode de transmission	13
I.3.2.2- Diagnostic	13
I.3.2.3- Traitement	13
I.4. Coinfection VHB-VHD	14

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel	15
II.1.1- Matériel biologique	15
II.1.2- Matériel non biologique	16
II.2. Méthodes d'analyse	17
II.2.1- Tests sérologiques	17
II.2.2- Test moléculaire	21
II.3. Etude statistique	24

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1- Répartition des cas selon le sexe	25
III.2- Répartition des cas selon l'âge	26
III.3- Répartition des cas selon le profil sérologique de l'hépatite B	28
III.4- Répartition des cas selon l'Ag HBe et la charge virale de l'hépatite B	29
III.5- Résultats de la sérologie de l'hépatite D	31
III.6- Résultats des quantifications d'ADN viral de l'hépatite B	31
III.6.1- Interprétation des graphes de la PCR en temps réel du VHB	31
III.6.2- Répartition des cas selon la charge virale de l'hépatite B versus sérologie de l'hépatite delta	33
Conclusion et perspectives	35
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des figures

Figure 1 : Photographie en microscope électronique des particules virales du VHB	3
Figure 2 : Structure des particules virales du VHB	3
Figure 3 : Organisation du génome du VHB	4
Figure 4 : Répartition géographique des génotypes du VHB à travers le monde	5
Figure 5 : Cycle de réplication du virus de l'hépatite B	7
Figure 6 : Photographie en microscope électronique des particules virales du VHD	8
Figure 7 : Structure des particules virales du VHD	8
Figure 8 : ARN génomique et antigénomique du VHD	9
Figure 9 : Cycle de réplication du virus de l'hépatite D	10
Figure 10 : Algorithme de diagnostic	17
Figure 11 : Réaction enzymatique	19
Figure 12 : Principe de la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan	22
Figure 13 : Suivi en temps réel d'une réaction PCR	24
Figure 14 : Répartition des patients VHB positif en fonction du sexe	25
Figure 15 : Répartition des patients VHB positif en fonction de l'âge et du sexe	27
Figure 16 : Répartition des prélèvements selon la charge virale de l'hépatite B	31
Figure 17 : Exemple de quantification par l'automate COBAS TaqMan	32
Figure 18 : Répartition des patients selon la charge virale de l'hépatite B versus sérologie de l'hépatite delta	34

Liste des tableaux

Tableau I : Matériel non biologique pour l'étude sérologique et moléculaire	16
Tableau II : Répartition des patients VHB positif en fonction de l'âge	26
Tableau III : Répartition des patients Ag HBs positif selon leurs profils sérologiques	29
Tableau IV : Répartition d'Ag HBe selon la charge virale du VHB	29

Liste des abréviations

Ac anti-VHD: Anticorps dirigé contre les protéines du virus delta (LHD, SHD)

Ac anti-HBc IgG: Anticorps totaux dirigé contre la protéine du core du virus de l'hépatite B de type immunoglobuline G

Ac anti-HBc IgM: Anticorps dirigé contre la protéine du core du virus de l'hépatite B de type immunoglobuline M

Ac anti-HBe: Anticorps dirigé contre la protéine précore du virus de l'hépatite B

Ac anti-HBs: Anticorps dirigé contre la protéine de surface du virus de l'hépatite B

ADNccc: Acide désoxyribonucléique circulaire covalentiellement clos

Ag HBc: Antigène de la capsid («core») du virus de l'hépatite B

Ag HBe: Antigène de la protéine précore du virus de l'hépatite B

Ag HBs: Antigène de surface ou d'enveloppe du virus de l'hépatite B

Ag VHD: Antigène du virus de l'hépatite delta

Anti-VHD IgG: anticorps dirigé contre le virus de l'hépatite delta de type immunoglobuline G

Anti-VHD IgM: anticorps dirigé contre le virus de l'hépatite delta de type immunoglobuline G

ALAT: Alanine aminotransférase

ASAT: Aspartate aminotransférase

CMIA: Immunologique microparticulaire par chimiluminescence

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CNR : Centre national de référence

Ct : Cycle seuil

CV: Charge Virale

dATP: désoxyadénosine triphosphate

dCTP: désoxycytidine triphosphate

dGTP: désoxyguanosine triphosphate

dNTP: désoxynucléotide triphosphate

dNTPs: désoxynucléosides triphosphate

dUTP: désoxyuridine triphosphate

EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

GT: Gamma T

HBSP: Hepatitis B Splice Protein

HBx: Protéine x du virus de l'hépatite B

IFN α : Interféron alpha

IPA: Institut Pasteur d'Algérie

kb: kilo base

kDa: kilo Dalton

L: Grande protéine (L = large) de l'enveloppe du virus de l'hépatite B

LHD: Grande protéine du virus de l'hépatite delta

LTc : Lymphocytes T cytotoxiques

M: Protéine moyenne (M = médium) de l'enveloppe du virus de l'hépatite B

Mn²⁺ : Manganèse

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF: Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)

ORF C: Open Reading Frame de cadre C

ORF S: Open Reading Frame de cadre S

pb: paire de base

PCR: Polymerase Chain Reaction

QS: Contrôle interne

RNase H: Ribonucléase H

RNP : Ribonucléoprotéine

S: Protéine majeure (S = Small) de l'enveloppe du virus de l'hépatite B

SHD: Petite protéine du virus de l'hépatite delta

TMB: Tetramethyl benzidine

TNF: Tumor necrosis factor

UI/ml : Unité International / millilitre

URL: Unités relatives de la lumière

VHB: Virus de l'hépatite B

VHD: Virus de l'hépatite delta

Glossaires

Aborigène : ce sont les premiers hommes à avoir habité l'Australie. Ils l'habitaient toujours lorsque les Européens ont débarqué, et l'habitent encore aujourd'hui (**Bosa, 2012**).

Amplicon: fragment d'ADN amplifié par PCR et délimité par les amorces sens et anti-sens (**Chiaroni et al., 2011**).

Autochtones : originaire du pays qu'il habite, dont les ancêtres ont vécu dans ce pays. (**Rousseau, 2011**).

Carcinome hépatocellulaire : tumeur maligne primaire du foie qui survient le plus souvent sur un foie cirrhotique ou sur un terrain d'hépatite chronique (**Sharon et al., 2011**).

Cirrhose : régénération anarchique du foie qui se rétrécit et se durcit en raison d'une cicatrisation irréversible (**Jérôme, 2009**).

Cytopathogène : le virus à un effet pathogène sur la cellule (**Patrick et Clair ; 2003**).

Fibrose : stade terminal pathologique et non réversible du processus de l'inflammation aboutissant au remplacement du tissu initial par un tissu cicatriciel non fonctionnel (**Jérôme, 2009**).

Fibrose hépatique : correspond à une formation excessive de matrice extracellulaire, en réaction à une inflammation du foie (**Thomas et Patrick ; 2009**).

Hépatite asymptomatique: inflammation du foie sans manifestation extérieures (**Dango et al., 2006**).

Hépatotrope : c'est un virus qui a une faveur à envahir le foie (**Elaine et Katja ; 2014**)

Réactivation de l'hépatite B : Réapparition d'une inflammation hépatique active à un patient connu pour avoir été dans l'état de porteur inactif de l'Ag HBs ou résolu l'hépatite B (**Rockstroh et al., 2008**).

Séroconversion : disparition de l'antigène et apparition de l'anticorps qui s'attaque au virus (**Guy et Hervé ; 2010**).

Phase d'immunotolérance : correspond à une tolérance immunitaire marquée par une réplication virale intense et une faible agressivité nécrotique inflammatoire hépatique (**Guy et Hervé ; 2010**).

Thalassémie : Maladie héréditaire caractérisée par un défaut de synthèse de l'hémoglobine, qui se traduit par une diminution de la taille des globules rouges et dans les formes sévères par une anémie (**Jeuge-Maynard et al., 2010**).

Transactivatrice : Molécule, en générale une protéine, qui se lie sur une région régulatrice d'un gène pour activer la transcription de celui-ci (**Rockstroh et al., 2008**).

Références bibliographiques

A

- ❖ **Allain J.P. 2006.** Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. *J Clin Virol.* 36.
- ❖ **Alter Miriam J. 2006.** Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol.* 44:6–9.
- ❖ **André F. 2000.** Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa. *Vaccine.* 18:20–22.
- ❖ **Andrisani O.M. 2013.** Deregulation of epigenetic mechanisms by the hepatitis B virus X protein in hepato-carcinogenesis. *5:858-872.*

B

- ❖ **Bakhshipour1 A, Mashhadi1 M, Mohammadi M, Nezam1 S.K. 2012.** Seroprevalence and Risk Factors of Hepatitis Delta Virus in Chronic Hepatitis B Virus Infection in Zahedan.
- ❖ **Ben Amora I, Rekika T, Hentatia N, Fkib H, Kharrata F, Gargouria J. 2009.** Facteurs influençant la prevalence de l'antigene HB chez des donneurs de sang tunisiens. Etude à propos de 275 300 donneurs de sang. *Transfus Clin Biol.*16:283–349.
- ❖ **Ben-Alaya-Bouafif N, Bahri O, Chlif S. 2010.** Heterogeneity of hepatitis B transmission in Tunisia: Risk factors for infection and chronic carriage before the introduction of a universal vaccine program. *Vaccine* 28; 3301-3307.
- ❖ **Benbekhti S. 2013.** Hépatites virales chroniques B et C CHU Tlemcen «2001-2009», 6^{ème} congrès –Français de Médecines interne-Communication Orale –Oran.
- ❖ **Berkane S. 2003.** Etude prospective anatomo-clinique des hépatites chroniques d'origine virale de l'adulte. Thèse pour le diplôme de doctorat d'état en sciences médicales, Alger.
- ❖ **Blumberg B.S, Alter H.J, Vinisch S. 1965.** A "New" Antigen In Leukemia Sera. *JAMA* : the journal of the American Medical Association 191, 541-546.
- ❖ **Bonnet S, Vernal A, Gersonde R, Lembke-Jenne L. 2012.** Modern distribution of dinocysts from the North Pacific Ocean in relation to hydrographic conditions, sea-ice and productivity. *Marine Micropaleontology*, 84-85. 87-113.
- ❖ **Bordier B.B, Ohkanda J, Liu P, Lee S.Y, Salazar F.H, Marion P.L. 2003.** In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *J Clin Invest.*112:407-414.

❖ **Bosa B. 2012.** Itinéraires aborigènes: histoire des relations raciales dans le Sud-Est australien. Edition : KARTHALA. 657 pages.

❖ **Bruss V. 2007.** Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol.* 13: 65-110.

C

❖ **Chain B.M, Myers R. 2005.** Variability and conservation in hepatitis B virus core protein. *BMC Microbiol.* 5: 33.

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

❖ **Chiaroni J, Roubinet F, Bailly P. 2011.** Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. Edition : John libbey Eurotext.350 pages.

❖ **Collier L, Oxford J. 2004.** Hépatites transmises par le sang : virus B et delta. éditeur Paris (France) : Flammarion Médecine-Sciences. ISBN : 978-2-257-11343-6.

D

❖ **Dan B, Makoto A, Fumio I, Yutaka Y, Tatsuo K, Keiichi F. 2011.** Long-term Follow-up of Patients with Hepatitis B e Antigen Negative Chronic Hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol.* 26(1):122-128.

❖ **Denis F, Alain S, Ratti-Loustaud V. 2004.** Virus des hépatites B et Delta. Paris: Elsevier.

❖ **Djebbi A, Rebai W.K, Bahri O, Hogga N, Sadraoui A, Triki H. 2009.** Serological markers, viral RNA and genotype of hepatitis delta virus in HBs antigen positive Tunisian patients. *Pathol Biol (Paris).*57:518–23.

❖ **Dango R.K, Bernard C, Danièle H. 2006.** Psychologie du risque: Identifier, évaluer, prévenir. Edition : Groupe de Boeck.348 pages.

E

❖ **Elaine M, Katja H. 2014.** Anatomie et physiologie humaines. Edition : Pearson Education France.1504 pages.

❖ **Elyse P, Houde A. 2002.** La PCR en temps réel : principe et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology by the Moroccan Society of Biology in Canada .*2:2-11.

F

❖ **Faou A. 2012.** Virologie humaine. Editeur Pradel. ISNB 2361100673, 9782361100674. 470 pages.

- ❖ **Forbi J.C, Iperepolu O.H, Zungwe T, Agwale S.M. 2012.** Prevalence of Hepatitis B Antigen e in Chronic HBV Carriers in North-central Nigeria. *J Health Popul Nutr.* 30(4):377–382.
- ❖ **Funk M.L, Rosenberg D.M, Lok A.S. 2002.** World-wide epidemiology of HBe Ag-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat.* 9:52-61.

G

- ❖ **Gaeta G.B, Stroffolini T, Chiaramonte M, Ascione T, Stornaiuolo G, Lobello S. 2000.** Chronic hepatitis D: a vanishing disease An Italian multicenter study. *Hepatology.* 32:824–7.
- ❖ **Gal F, Gault E, Ripault M.P, Serpaggi J, Trinchet J.C, Gordien E. 2006.** Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis.* 12:1447-1450.
- ❖ **Ganem D. 2001.** Virology. The X files-one step closer to closure. *Science* 294, 2299-2300.
- ❖ **Ganem D, Prince A.M. 2004.** Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med,* 350, 1118-29.
- ❖ **Gourari S. 2012.** Analyse moléculaire de souches de virus des hépatites B et D provenant de patients Algériens. Thèse pour l’obtention du grade de docteur en sciences médicales, Alger.
- ❖ **Guy P.M, Hervé M. 2010.** Maladies d’élevage des porcs: diagnostics, causes, traitements. Edition : France Agricole. 601 pages.

H

- ❖ **Halfon M.S, Gisselbrecht S, Lu J, Estrada B, Keshishian H, Michelson A.M. 2002.** New fluorescent protein reporters for use with the Drosophila Gal4 expression system and for vital detection of balancer chromosomes. *genesis.* 34: 135-138.
- ❖ **Hassanjani-Roshan M.R, Taheri H. 2002.** Frequency of Chronic Active Hepatitis in Asymptomatic HBV Carriers in Babol, Iran. *Arch Iranian Med .*5:90-100.
- ❖ **Huang C.C, Kuo T.M, Yeh C.T, Hu C.P, Chen Y.L, Tsai Y.L, Chen M.L, Chou Y.C, Chang C. 2013.** One single nucleotide difference alters the differential expression of spliced RNAs between HBV genotypes A and D. *Virus Res.* 174:18-26.
- ❖ **Huraux J.M. 2003.** Traité de virologie médicale. Édition De Boeck Secondaire. 699 pages.
- ❖ **Hoofnagle J.H, Doo E, Liang T.J, Fleischer R, Lok A.S. 2007.** Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology.* 45:1056-75.

J

- ❖ **Jérôme H. 2009.** L'alcool, moi et les autres. Edition: Springer Science & Business Media. 132 pages.
- ❖ **Jeuge-Maynard I, Caron A, Trouvelot M.H. 2010.** Le petit Larousse de la médecine.

K

- ❖ **Kao J.H, Chen D.S. 2002.** Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2:395–403.
- ❖ **Karimi A, Amini Safieh A.A. 2000.** Investigation and Comparison of hepatitis D prevalence in dialysis patients and the donors of HBs Ag carrier. *Teb va Tazkieh.*36:3.
- ❖ **Kay A, Zoulim F, Trepo C. 2004.** Structure, cycle viral et variation du virus de l'hépatite B. In: Denis F, Trepo C, editors. *Virus des hépatites B et delta.* Paris: Elsevier. 15–40.
- ❖ **Khelifa F, Thibault V. 2009.** Caractéristiques des souches virales responsables d'hépatites B chroniques en Algérie du Nord-Est. *Pathol Biol.* 57:107–113.
- ❖ **Kim E.S, Seo Y.S, Keum B, Kim J.H, Yim H.J, Kim Y.S. 2011.** The HBV DNA cutoff value for discriminating patients with HBe Ag negative chronic hepatitis B from inactive carriers. *Hepat Mon.* 11: 351-357.
- ❖ **Kitab B, Essaid El Feydi A, Afifi R. 2011.** Hepatitis B genotypes / sub genotypes and MHR variants among Moroccan chronic carriers. *Journal of infection.* 63, 66 75.

L

- ❖ **Lavanchy D. 2004.** Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat.*11: 97-107.
- ❖ **Leluzzi D, Covolo L, Domato F, Fattovich G. 2014.** Progression to cirrhosis, hepatocellular carcinoma and liver-related mortality in chronic hepatitis B patients in Italy. *Digestive and Liver Disease* 46; 427-432.
- ❖ **Lemoine M, Nayagam S, Thursz M. 2013.** Viral hepatitis in resource limited countries and access to antiviral therapies: current and future challenges. *Future Virol.* 8:371-380.
- ❖ **Lucifora J. 2008.** Etude de la réplication du VHB et de la réponse à l'intracellulaire à l'infection virale. *Biologie cellulaire.* Université Claude Bernard - Lyon I. Français.
- ❖ **Lunel-Fabiani F, Mansour W, Amar A.O, Aye M, Gal F, Malick F.Z. 2014.** Impact of hepatitis B and delta virus co-infection on liver disease in Mauritania: a cross sectional study. *J Infect.* 67:448-457.

M

- ❖ **Maiga I, Venard V, Muller C, Faou A. 2003.** Évolution du virus de l'hépatite B. Bull Soc Fr Microbiol. 18:281–6.
- ❖ **Mammette A. 2002.** Virologie médicale, presse universitaire de lyon, ISBN : 2-7297-0663-1, 789 pages.
- ❖ **Mansour W, Malick F.Z, Sidiya A, Ishagh E, Chekaraou M.A, Veillon P. 2012.** Prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta virus in pregnant women and in patients in Mauritania. J Med Virol. 84:1186-1198.
- ❖ **Marcellin P, Asselah T. 2008.** Hépatite virales, progrès en hépato-gastroentérologie. éditeur Doin, 383 pages.
- ❖ **Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, Drucker J, Bagros P. 1976.** Immunisation against hepatitis B in man. Lancet I: 1367-1370.
- ❖ **Mboup S, Gershy-Damet G.M, Touré Kane C, Bélec L. 2015.** Biologie appliquée de l'infection à VIH et de ses comorbidités en Afrique. édition John Libbey Eurotext. 446 pages.
- ❖ **Moura I.F, Lopes E.P, Alvarado-Mora M.V, Pinho J.R, Carrilho F.J. 2013.** Phylogenetic analysis and sub genotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. Infect Genet Evol. 14:195–199.
- ❖ **Moussard C. 2005.** Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires. De Boeck Supérieur. 328 pages.

N

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

P

- ❖ **Papatheodoridis G.V, Manolakopoulos S, Liaw Y.F, Lok A. 2012.** Followup and indications for liver biopsy in HBe Ag-negative chronic hepatitis B virus infection with persistently normal ALT: a systematic review. J Hepatol. 57:196-202.
- ❖ **Patient R, Hourieux C, Roingeard P. 2009.** Morphogenesis of hepatitis B virus and its sub viral envelope particles. Cellular microbiology 11, 1561-1570.
- ❖ **Patient R, Hourieux C, Sizaret P.Y, Trassard S, Sureau C, Roingeard P. 2007.** Hepatitis B virus sub viral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. Journal of virology 81, 3842-3851.

- ❖ **Patrick A, Clair A. 2003.** Glossaire Sur L'hématologie Et Les Produits Sanguins. Edition : Council of Europe. 332 pages.
- ❖ **Perscott L.M, Harley J.P, Klein D.A. 2010.** Microbiologie, édition De Boeck, Bruxelles, ISBN 2-804-14256-6, 1137 pages.
- ❖ **Pioche C, Brouard C, Chevaliez S, Alric L, Couzigou P, Delaroque –Astagneau E. 2014.** Hépatite B chronique: prise en charge en France entre 2008 et 2014, Bull Epidémiol. Hebd; (12): 210-6.
- ❖ **Prince A.M. 1968.** An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60: 814-821.

R

- ❖ **Rabbi F.J, Rezwan M.K, Shirin T. 2008.** HBe Ag/anti-HBe, alanine aminotransferase and HBV DNA levels in HBs Ag positive chronic carriers. Bangladesh Med Res Council Bull. 34:39-43.
- ❖ **Richard S, Tedder, Alison J. Rodger. Iori Fries. Samfeen Ijaz. 2013.** The diversity and management of chronic hepatitis B virus infections in the United Kingdom: Awake –up call. Clinical Infections Diseases; 56 (7) 951-60.
- ❖ **Rizzetto M. 1990.** Hepatitis delta: the virus and the disease. *J Hepatol.* 11 Suppl 1:S145–8.
- ❖ **Rizzetto M. 1983.** The delta agent. *Hepatology.* 3:729-737.
- ❖ **Rizzetto M, Canese M.G, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G. 1977.** Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBs Ag carriers. 18:997-1003.
- ❖ **Robertson B.H, Margolis H.S. 2004.** Primate hepatitis B viruses-genetic diversity, geography and evolution. *Rev Med Virol.* 12:133–141.
- ❖ **Rockstroh J.K, Bhagani S, Benhamou Y. 2008.** Guidelines for the clinical management and treatment of chronic Hepatite B and C and Co-infection in HIV-infected Adulte. *HIV Med;* 9:82–88.
- ❖ **Roseman A.M, Berriman J.A, Wynne S.A, Butler P.J, Crowther R.A, 2005.** A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15821-15826.
- ❖ **Rosina F, Rizzetto M. 2005.** Epidemiology and natural history of hepatitis D. In: Thomas HC, Lemon SM, Zuckerman AJ, eds. *viral hepatitis.* Third ed. Oxford, UK: Blackwell. 583–592.

- ❖ **Rousseau L. 2011.** Religions des peuples autochtones au nord de l'Amérique. Edition : KARTHALA. 163 pages.

S

- ❖ **Samuel B, Bernard L. 1995.** Maladies des pigeons: manuel pratique
- ❖ **Sbai A. 2012.** Epidémiologie, génotype et facteurs de risque de l'hépatite virale B au Maroc. Thèse de doctorat en virologie.
- ❖ **Sbai A, Baha W, Ougabrai H, Allalia T, Dersi N, Lazaar F, Ennaji M.M, Benjouad A, El Malki A, Hassar M, Benani A. 2011.** Prévalence de l'infection par le virus de l'hépatite B et l'évaluation des facteurs de risque au Maroc.
- ❖ **Shao J, Wei L, Wang H, Sun Y, Zhang L.F, Li J, Dong J.Q. 2007.** Relationship between hepatitis B virus DNA levels and liver histology in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol.* 13:2104-2107.
- ❖ **Sharon M.L, Margaret M, Shannon R.D. 2011.** Edition: Groupe de Boeck. 2905 pages.
- ❖ **Seeger C, Mason W.S. 2000.** Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 51-68.
- ❖ **Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr M.J, Higgins D.G. 2013.** Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect Genet Evol.*16:355–361.
- ❖ **Soussan P, Garreau F, Zylberberg H, Ferray C, Brechot C, Kremsdorf D. 2000.** In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest.* 105:55–60.

T

- ❖ **Taylor J.M. 2012.** Virology of hepatitis D virus. *Semin Liver Dis.* 32:195-200.
- ❖ **Thomas L, Patrick M. 2009.** Hépatite B: prévenir, détecter, traiter. Edition : John Libbey Eurotext. 41pages.
- ❖ **Triki H, Said N, Ben Salah A, Arrouji A, Ben Ahmed F, Bouguerra A. 1997.** Sero-epidemiology of hepatitis B, C and delta viruses in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 91: 11–14.

V

- ❖ **Van der Eijk A, Niesters H.G.M, Gotz H.M, Janssen H.L.A, Schalm S.W, Osterhaus A.D.M.E. 2004.** 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.* 29:92–94.

W

- ❖ **Walsh R, Locarnini S. 2012.** Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise. 53 : 875-885.
- ❖ **Wagner A, Denis F, Ranger-Rogez S, Loustaud-Ratti V, Alain S. 2004.** Génotypes du virus de l'hépatite B. Service de bactériologie, virologie, hygiène, Médecine Interne, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges cedex, France.

Y

- ❖ **Yang J, Luo Q, Zhang C, Wang H. 2009.** Study on HBV vertical transmission via the in vitro fertilization (IVF) technique. J Reprod Contracept. 20:73–79.

Z

- ❖ **Zarski J.P, Marcellin P, Leroy V, Trepo C, Samuel D, Ganne-Carrie N. 2006.** Characteristics of patients with chronic hepatitis B in France: predominant frequency of HBe antigen negative cases. Fédération nationale des Pôles de référence et des Réseaux Hépatites. J Hepatol. 45(3):355-60.
- ❖ **Zoulim F, Locarnini S. 2013.** Optimal management of chronic hepatitis B patients with treatment failure and antiviral drug resistance. 1:116-124.

Résumé

Le virus de l'hépatite D (VHD) est un virus défectueux dépendant du virus de l'hépatite B (VHB) pour sa répllication. Le VHD infecte uniquement les patients qui sont déjà infectés par le VHB en provoquant des maladies du foie accélérées.

Cette étude visait à déterminer la fréquence de l'hépatite D chez les patients atteints de l'hépatite B ainsi que l'influence de l'hépatite D sur les variations de la charge virale et sur l'évolution clinique de l'hépatite B en cas de coïnfection VHB-VHD.

Pour cela, une étude à été menée au niveau du Laboratoire des Virus des Hépatites de l'Institut Pasteur d'Algérie Annexe de Sidi-Fredj. L'étude a concerné 159 patients Ag HBs positifs des différentes wilayas de l'Algérie. Une quantification de l'ADN du VHB a été réalisée par PCR en temps réel, puis une recherche des IgG anti-VHD (les anticorps anti-VHD de type IgG ne sont pas protecteurs, mais coexistent avec des virions circulants.les IgG anti-VHD persistent à des titres élevés au cours des infections chroniques aussi longtemps que l'infection par le VHD se poursuit), a été effectuée pour l'ensemble des prélèvements afin de déterminer la fréquence de la coïnfection VHB-VHD.

La population étudiée comprenait 84 (52.83%) hommes et 75 (47.17%) femmes avec un Sex Ratio de 1.12. L'âge des patients est compris entre 12-82 ans (38.37 ± 14.92). La tranche d'âge la plus touchée par le VHB est 30- 45 ans (42.77%). La recherche de la coïnfection a concerné tous les prélèvements porteurs du virus B et dont la charge virale était ≥ 2 log UI/ ml et tous (159) étaient négatif en anticorps anti-VHD.

Mots clés : Hépatite virale, VHB, VHD, coïnfection, PCR en temps réel.

Abstract

The hepatitis D (HDV) is a defective virus dependent on hepatitis B virus (HBV) for its replication. HDV infects patients who are already infected with HBV and cause accelerated liver diseases.

This study aimed to determine the frequency of hepatitis D in patients affected by hepatitis B. Furthermore, the influence of hepatitis D on the variations of the viral load and on the clinical evolution of hepatitis B in case of HBV-HDV coinfection was also studied.

For it, a study was conducted at the Laboratory of Hepatitis Virus of the Pasteur Institute of Algeria Annex Sidi-Fredj. The study concerned 159 patients HBs Ag positive from different wilayas of Algeria. A quantification of HBV DNA was realised by real-time PCR, then a search for anti-HDV IgG (IgG anti-VHD antibodies are not protective but coexist with circulating virions. IgG Anti-HDV persists at high titres during chronic infections as long as HDV infection continues), was performed for all samples to determine the frequency of HBV-HDV coinfection.

The study population included 84 (52.83%) man and 75 (47.17%) women with Sex Ratio of 1.12. The age of the patients is between 12-82 years (38.37 ± 14.92). The age group most affected by HBV is 30- 45 years (42.77%). The search for the coinfection concerned all the takings carrying the virus B and the viral load of which was ≥ 2 log UI/ml and all (159) were negative in anti-HDV antibody.

Keywords: Viral hepatitis, HBV, HDV, coinfection, real-time PCR.

ملخص

فيروس التهاب الكبد D هو فيروس معيب يعتمد على الفيروس B لكي يتضاعف. VHD يصيب فقط المرضى المصابين بفيروس التهاب الكبد B مسبب أمراض الكبد المتسارعة.

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد نسبة التهاب الكبد D عند المرضى الذين يعانون من التهاب الكبد B . زيادة عن ذلك، تأثير التهاب الكبد D على التغيرات في الحمل الفيروسي وبطبيعة الحال التطورات السريرية لالتهاب الكبد B في حالة عدوى مرافقة VHB-VHD.

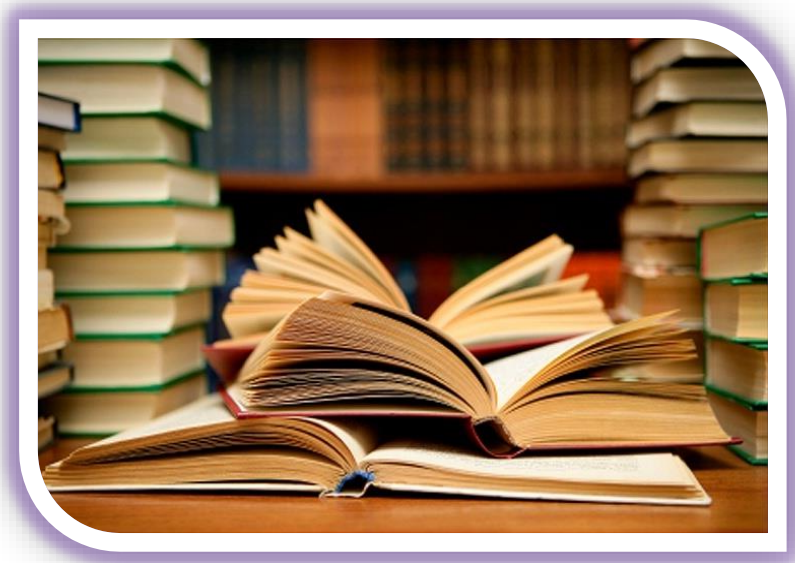
لهذا أجريت دراسة في المخبر التهاب فيروس الكبد لمعهد باستور في الجزائر الملحق سيدي فرج. شملت الدراسة 159 مريضا إيجابيا Ag HBs من مختلف ولايات الجزائر. تم إجراء القياس الكمي للحمض النووي للفيروس B بواسطة PCR en temps réel، وإجراء بحث للأجسام المضادة IgG anti-VHD (الأجسام المضادة لمكافحة VHD مفتش ليست وقائية، ولكن تتعايش مع الفيروسات المتداولة. IgG anti-VHD تستمر بعيارات عالية خلال عدوى مزمنة طالما تستمر الإصابة VHD) لجميع العينات و ذلك لتحديد نسبة عدوى مرافقة VHB - VHD.

شملت عينة الدراسة 84 (52.83%) رجل و 75 (47.17%) امرأة مع نسبة الجنس 1.12 . أعمار المرضى تتراوح بين 12-82 سنة (38.37 ± 14.92). الفئة العمرية الأكثر تضررا ب VHB هي 30-45 سنة (42.77%). البحث عن العدوى المرافقة شملت كل العينات الحاملة للفيروس B ذات الشحنة الفيروسية الأكبر أو تساوي 2 logs UI/ml و كل (159) كان سلبي أجسام المضادة ضد الفيروس D .

الكلمات المفتاحية: التهاب الكبد الفيروسي, VHB, VHD , عدوى مرافقة، PCR في الوقت الحقيقي.



Introduction



Chapitre I

Recherche bibliographique



Chapitre II

Matériel et méthodes



Chapitre III

Résultats et discussion

Introduction

Les hépatites sont des lésions inflammatoires du foie qui peuvent évoluer vers une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (**Perscott et al., 2010**) dont les causes peuvent être multiples : infectieuse, médicamenteuse, alcoolique ou auto-immune (**Lucifora, 2008**). Quelle que soit l'origine, des signes cliniques, biologiques et histologiques communs peuvent s'observer au cours des hépatites, tels que l'ictère, l'augmentation de la concentration des transaminases dans le sang et la fibrose hépatique (**Denis et al., 2004**).

Les hépatites infectieuses particulièrement virales constituent un problème de santé publique mondiale majeur. Malgré l'existence d'un vaccin efficace (**Lavanchy, 2004**), le virus de l'hépatite B (VHB) infecte plus de 2 milliards de personnes dont plus de 350 millions d'individus atteints d'hépatite chronique et environ 1 million de morts par ans (**Hoofnagle et al., 2007**). Il est également estimé que plus de 5 % des personnes infectées par VHB le seraient aussi par le virus de l'hépatite delta (VHD) causant une aggravation de la maladie hépatique (**Rosina et Rizzetto ; 2005**).

Le VHD est un virus défectif, satellite de virus de l'hépatite B. Il peut être ainsi acquis en même temps que le VHB (coïnfection) ou venir compliquer une hépatite B chronique (surinfection) (**Bonnet et al., 2012**).

Ce présent travail, a été réalisé au laboratoire des Virus des Hépatites de l'institut Pasteur d'Algérie - Annexe Sidi-Fredj. Cette étude est basée dans un premier temps, sur une étude sérologique puis moléculaire pour la détection des patients porteurs du virus de l'hépatite B et ayant des charges virales élevées. Dans un deuxième temps, une autre étude sérologique afin de dépister une éventuelle coïnfection VHB-VHD a également été entreprise.

L'objectif de notre étude est de déterminer la fréquence de l'hépatite D chez les patients atteints de l'hépatite B ainsi que l'influence de l'hépatite D sur les variations de la charge virale et sur l'évolution clinique de l'hépatite B en cas de coïnfection VHB-VHD.

I.1. Historique sur les hépatites B et D

Le « premier traité de médecine » écrit 3000 ans avant J.C, décrivait déjà les symptômes associés à une jaunisse. A chaque époque de l'histoire de la médecine, les praticiens attribuèrent une ou plusieurs explications particulières à la jaunisse. Ce n'est qu'avec le développement des techniques médicales telles que la vaccination ou la transfusion que le concept d'hépatite sérique, suivi de celui d'hépatite B fit son apparition (**Lucifora, 2008**).

Les hépatites virales sont des maladies infectieuses du tissu hépatique qui peuvent évoluer vers la cirrhose ou le cancer du foie. A ce jour cinq virus à l'origine des hépatites sont connus A, B, C, D (delta) et E (**Denis et al., 2004**).

I.1.1- Découverte du virus de l'hépatite B

C'est en 1964 que Blumberg et son équipe découvrirent un nouvel antigène qui réagissait spécifiquement avec des sérums des patients hémophiles américains polytransfusés (**Blumberg et al., 1965**). Cet antigène nommé antigène Australia a été mis en évidence dans le sang d'un aborigène australien atteint d'hépatite (**Prince, 1968**).

En 1975, l'équipe de Maupas, publie les premiers résultats d'une vaccination contre le virus de l'hépatite B (VHB) utilisant comme source vaccinale l'antigène Australia purifié à partir de plasma de porteurs chroniques (**Maupas et al., 1976**).

Selon **Huraux (2003)**, En 1986, le premier vaccin mondial contre l'hépatite B obtenu par génie génétique est commercialisé.

I.1.2- Découverte du virus de l'hépatite D

L'antigène delta a été identifié pour la première fois en 1977 par Rizzetto en Italie à partir d'une analyse en immunofluorescence de biopsie de foie des porteurs chroniques du virus de l'hépatite B (**Rizzetto et al., 1977**); en effet, il fut démontré qu'il existait dans le noyau des hépatocytes de certains malades infectés par le VHB un antigène distinct des antigènes de surface (Ag HBs) et de capsid (Ag HBc) du VHB. Des études réalisées chez le chimpanzé puis chez l'homme ont par la suite permis de montrer que l'infection delta, si elle nécessite une infection préalable (surinfection) ou associée (coïnfection) par le VHB, est cependant due à un virus différent du virus B (**Rizzetto, 1983**).

I.2. Caractéristiques des virus de l'hépatite B et D

I.2.1- Caractéristiques du virus de l'hépatite B

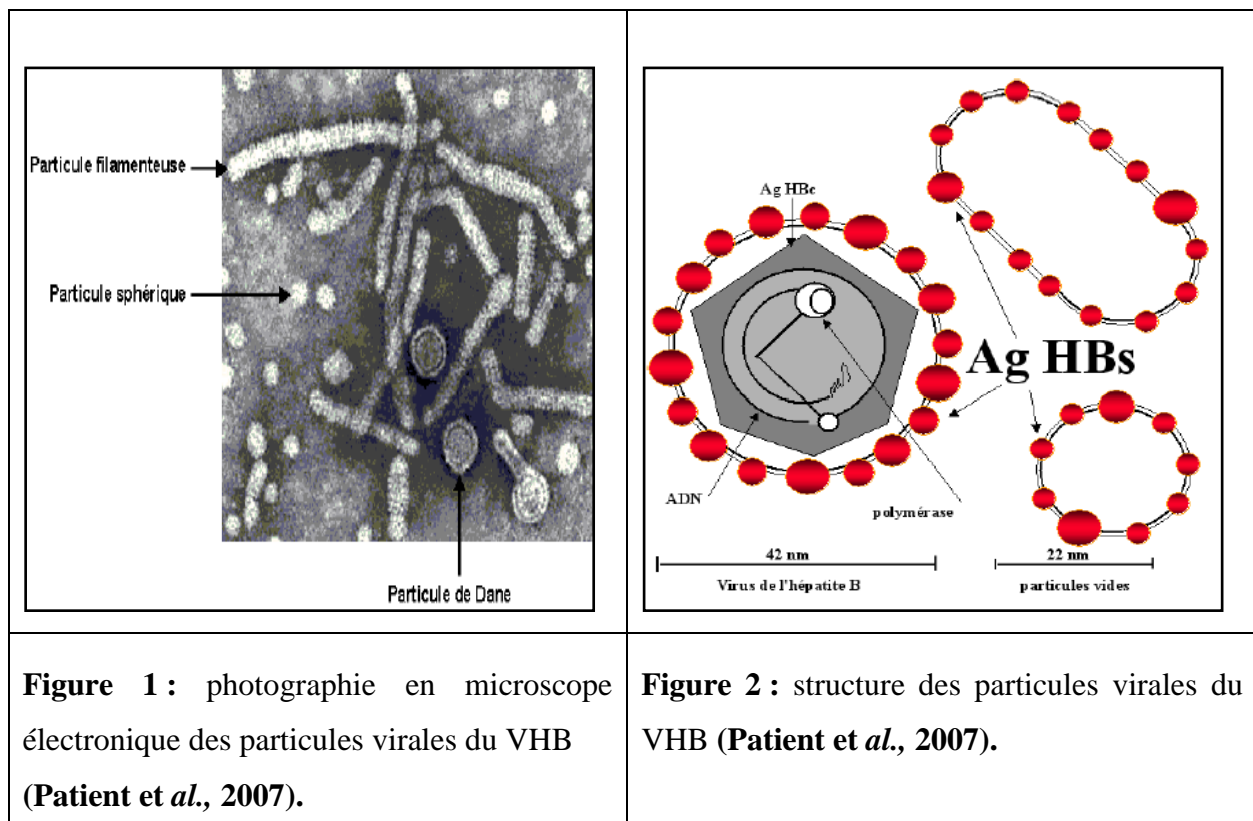
I.2.1.1- Classification taxonomique

Le VHB appartient à la famille des *Hepadnaviridae*, virus à ADN hépatotrope. Cette famille regroupe deux genres : *Orthohepadnavirus* et *Avihepadnavirus* (Maiga et al., 2003).

- Le genre *Orthohepadnavirus* comprend le virus de l'hépatite B humain ainsi que les virus des rongeurs et les virus des singes.
- Le genre *Avihepadnavirus* regroupe les virus du canard de Pékin, du héron et de l'oie des neiges. Ils diffèrent des virus des mammifères par l'absence du gène X (Robertson et Margolis ; 2004).

I.2.1.2- Structure

Le virus de l'hépatite B est une particule sphérique de 42 nm de diamètre appelée particule de Dane. C'est la particule infectieuse, composée d'une nucléocapside, renfermant l'ADN et la polymérase, et d'une enveloppe formée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées des protéines de surface. Le sérum des malades referme également des particules non infectieuses de 22 nm de diamètre, qui prennent la forme de sphères ou de bâtonnets et qui correspondent à un excès d'enveloppes vides voire figure 1 et 2 (Kay et al., 2004).



I.2.1.3-Organisation génétique

Le génome du VHB est constitué d'un ADN circulaire, partiellement double brin et non fermé de manière covalente. Il comporte un brin complet (brin moins) qui contient la totalité du patrimoine génétique du virus et un brin incomplet (brin plus) non codant (Figure 3). Ce génome comporte en moyenne 3200 paires de bases (pb). Compte tenu de sa petite taille. Il est très compact. Il comporte 4 phases ouvertes de lecture (Open Reading Frame, ORF) : S, C, P et X qui sont chevauchantes, et des régions régulatrices : 2 enhanceurs et 4 promoteurs (Seeger et Mason ; 2000).

On distingue quatre gènes principaux :

- Le gène pré S/S codant les trois protéines de surface : S pour la protéine majeure, pré S2/S pour la protéine moyenne, et pré S1/pré S2/S pour la grande protéine.
- Le gène pré C/C code pour la région pré C une séquence signal nécessaire à l'insertion dans les membranes du réticulum endoplasmique d'un peptide de 25 kDa. Après maturation, un peptide de 15-16 kDa est sécrété sous forme soluble dans le plasma et porte les déterminants de l'Ag HBe. En l'absence de cette séquence signal, l'Ag HBe est synthétisé ; c'est une protéine cytoplasmique de 21 kDa qui s'assemble pour former la capsid virale (Huraux, 2003).
- Le gène P code la polymérase virale (Nassal, 2008).
- Le gène X code la protéine X qui a une fonction transactivatrice sur les promoteurs de l'ADN du VHB et sur des promoteurs du génome de l'hôte (Kay et al., 2004).

Ces ORF couvrent la totalité du génome et les séquences régulatrices sont également des séquences codantes (Huraux, 2003).

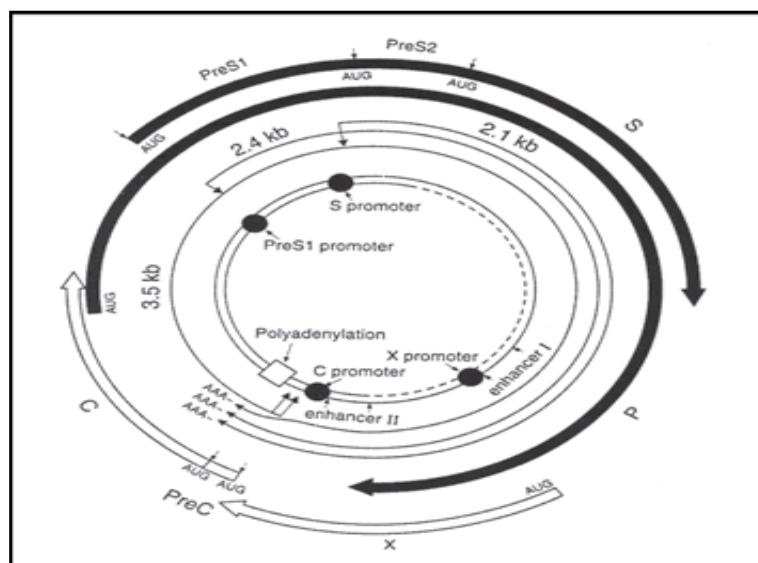


Figure 3 : organisation du génome du VHB (Kay et al., 2004).

I.2.1.4- Génotypes et leur répartition géographique

Le VHB se différencie en plusieurs génotypes, selon la séquence du génome. À ce jour, huit génotypes bien connus (A-H) ont été définis. En outre, deux nouveaux génotypes, I et J, ont été également identifiés. Les génotypes A, B, C, D et F sont divisés en différents sous-génotypes; aucuns sous-génotypes n'ont été définis pour E, G, H, I et J (**Huang et al., 2013**). De nombreuses études ont rapporté que différents génotypes et sous-génotypes montrent une répartition géographique différente (Figure 4), et sont liés à la progression de la maladie, la progression clinique, la réponse au traitement antiviral, le pronostic (**Moura et al., 2013**), et la voie d'exposition (**Allain, 2006**).

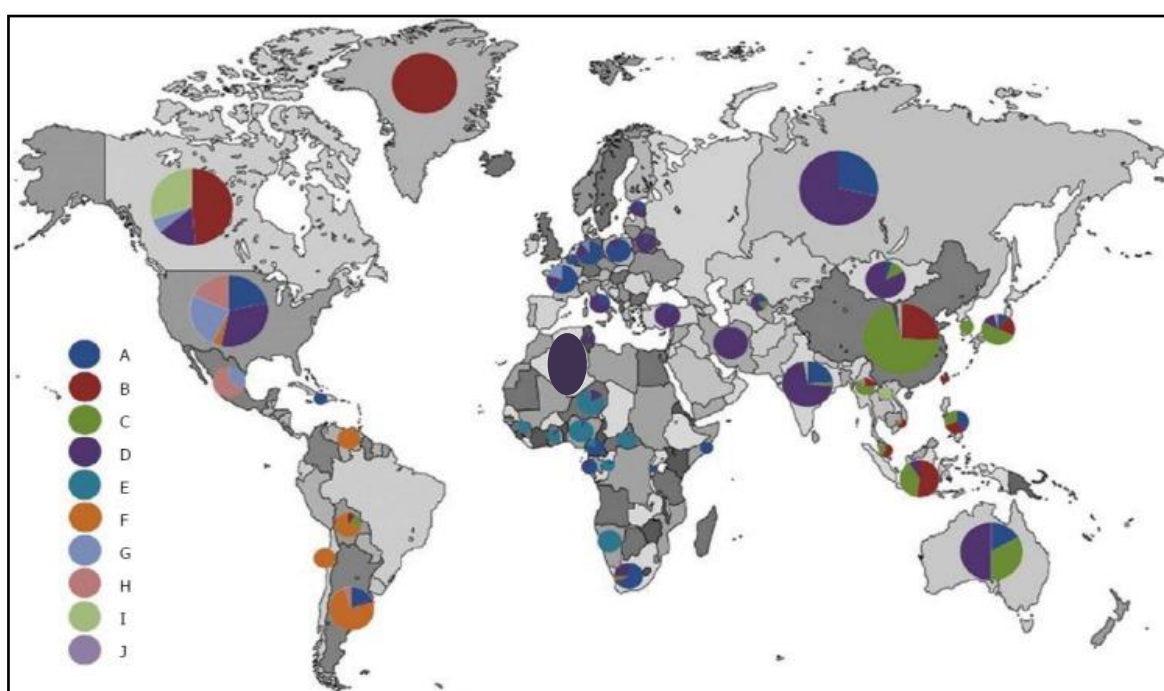


Figure 4 : répartition géographique des génotypes du VHB à travers le monde (**Shi et al., 2013**).

I.2.1.5- Protéines virales

❖ Protéines de surface (ou d'enveloppe)

L'enveloppe de VHB est composée de trois protéines: petite S, moyenne M et grande L. Sur le génome viral, ces trois protéines sont codées par un même cadre ouvert de lecture nommé ORF S contenant trois codons d'initiation de traduction (**Bruss, 2007**). Les protéines d'enveloppe ne diffèrent donc que par la longueur de leur extrémité N-terminale (**Roseman et al., 2005**).

❖ Protéines de la capsid et la protéine précore

Dans l'ORF C, deux codons d'initiations servent à la traduction de : la protéine de capsid (Protéine core ou Ag HBc) qui est une protéine phosphorylée de 21 kDa produite par traduction de l'initiation au 2^{ème} AUG de pré C/C (**Chain et Myers ; 2005**), et d'une protéine soluble (protéine précore « 25 kDa » ou protéine E ou Ag HBe) qui est le précurseur de l'Ag HBc. Elle est synthétisée à partir du premier codon ATG du cadre C. La présence de cette protéine est le témoin d'une répllication virale (**Patient et al., 2009 , Walsh et Locarnini ; 2012**).

❖ Polymérase

Le gène P qui correspond à 80% du génome code la polymérase virale qui est composée de trois domaines fonctionnels (**Nassal, 2008**) correspondant de 5' en 3' respectivement au:

- ✓ Domaine N-terminal qui se lie à l'extrémité 5' du brin (-) d'ADN ; il est nécessaire car il sert également d'amorce à l'initiation de la synthèse de ce brin.
- ✓ Domaine intermédiaire ou espaceur qui ne correspond à aucun peptide mais dont la taille et le repliement permettent une interaction des différents domaines avec le génome viral. Elle est également indispensable pour assurer l'encapsidation de l'acide nucléique
- ✓ Domaine pour la transcriptase inverse, et un pour la RNase H (**Zoulim et Locarnini ; 2013**).

❖ Protéine X

La protéine X ou HBx (17 kDa), porte la spécificité antigénique HBx. Sa structure est conservée parmi les souches du VHB malgré de grande variation de séquence. Elle possède une activité protéine kinase et assurerait sa propre phosphorylation. Elle possède également une activité transactivatrice pour la transcription de certains gènes viraux et des gènes cellulaires (**Andrisani, 2013**).

❖ La protéine HBSP (*Hepatitis B Splice Protein*)

Cette protéine d'environ 10 kDa résulte de l'épissage de l'ARN pré-génomique, qui sert à la traduction de la polymérase. Elle est constituée d'une région N-terminale identique à celle de la polymérase et d'une région C-terminale spécifique, différente des autres protéines du fait de l'épissage (**Soussan et al., 2000**).

I.2.2- Cycle de réplication du virus de l'hépatite B

La réplication du VHB nécessite le passage par un ARN intermédiaire. Elle se déroule comme suite (Figure 5):

- Le virus pénètre dans l'hépatocyte, se défait de son enveloppe et de sa capside et libère son ADN (décapsidation).
- L'ADN entre dans le noyau et est « complété » en ADN bicaténaire clos (ADN circulaire covalentiellement clos ou ADNccc) (super-enroulement) grâce à l'ADN polymérase virale (par allongement des brins et ligature).
- L'ADNccc est alors transcrit en ARN par l'ARN polymérase cellulaire. Les ARN messager (ARNm) sont traduits en protéines virales. L'un d'eux, appelé ARN pré-génomique, est en outre la matrice de la réplication du génome.
- L'ARN pré-génomique et l'ADN polymérase virale sont encapsidés.
- L'ADN polymérase exerce cette fois une activité rétrotranscriptase qui synthétise le brin ADN (-). Après hydrolyse de l'ARN matrice, la synthèse du brin (+) complémentaire a lieu, partiellement car elle est interrompue lorsque l'enveloppe recouvre la capside.
- La nucléocapside est enveloppée et libérée (Moussard, 2005).

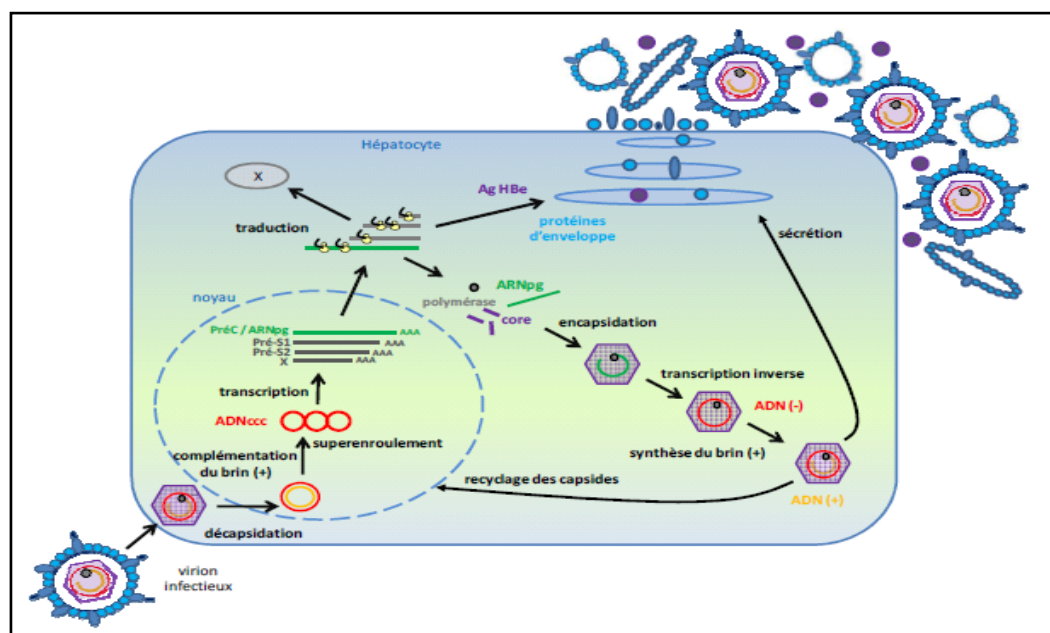


Figure 5 : cycle de réplication du virus de l'hépatite B (Lucifora, 2008).

I.2.3- Variabilité génétique du virus de l'hépatite B

La 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 est favorisé par l'important niveau de production du VHB (Ganem, 2001).

La majorité des variantes ainsi formés sont défectives et ne peuvent se multiplier. Cependant, il arrive que certaines mutations influencent peu la biologie du virus et aboutissent à l'émergence des 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 (Halfon et al., 2002).

On peut distinguer deux grandes classes de variants : des variants génotypiques, qui représentent différents types de souches sauvages, et des variants phénotypiques, qui ont des propriétés différentes de la souche sauvage d'origine (Wagner et al., 2004).

I.2.4- Caractéristiques du virus de l'hépatite D

I.2.4.1- Structure

La particule virale VHD est constituée d'une ribonucléoprotéine (RNP), enveloppée d'une membrane contenant l'Ag HBs. En microscope électronique, le VHD apparaît comme une particule virale hétérogène de 35-37 nm de diamètre (Figure 6). La RNP du VHD comporte le génome et les protéines delta. Cette RNP s'entoure d'une enveloppe constituée par une membrane dérivée du réticulum endoplasmique contenant les protéines L, M et S du VHB portant l'antigène de surface (Figure 7) (Marcellin et Asselah ; 2008).

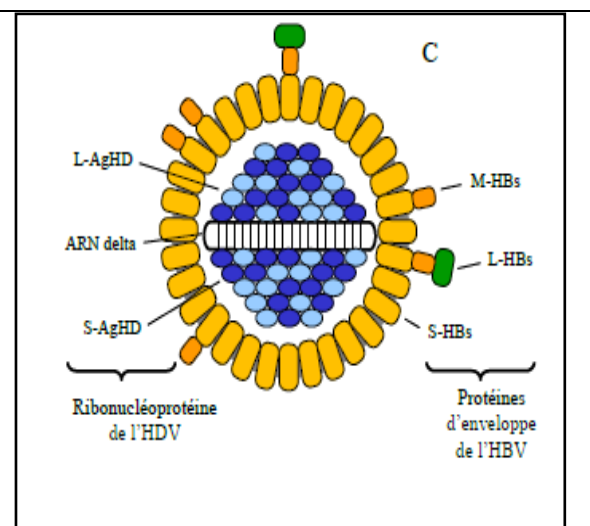
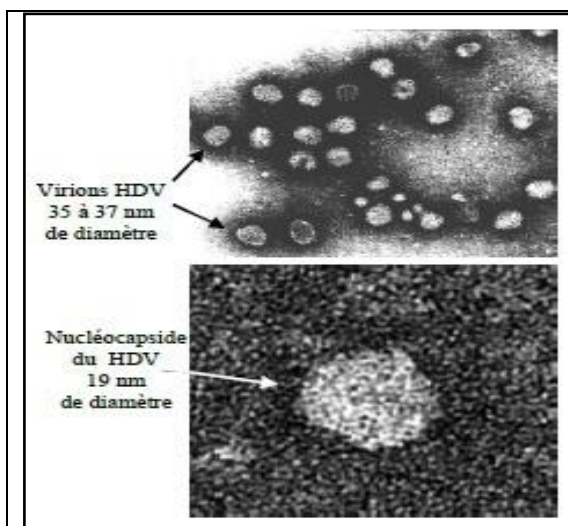


Figure 6: photographie en microscopie électronique des particules virales du VHD (Taylor, 2012).

Figure 7 : structure des particules virales du VHD (Taylor, 2012).

I.2.4.2- Organisation génétique

Le génome du VHD est un ARN monocaténaire circulaire de polarité négative. C'est le plus petit génome connu des virus infectant les mammifères dont la longueur varie entre 1679 et 1683 nucléotides (environ 1,7 kb). Avec un pourcentage en GC de 60%, la recherche d'une structure secondaire indique 70% des nucléotides s'appariant pour former une structure linéaire pseudo-double brin « en bâtonnet » (Figure 8). Ce génome code pour 2 polypeptides : SHD (ou p24) et LHD (ou p27), qui portent l'antigène du virus de l'hépatite delta (Ag VHD) et qui sont associés à l'ARN (Faou, 2012).

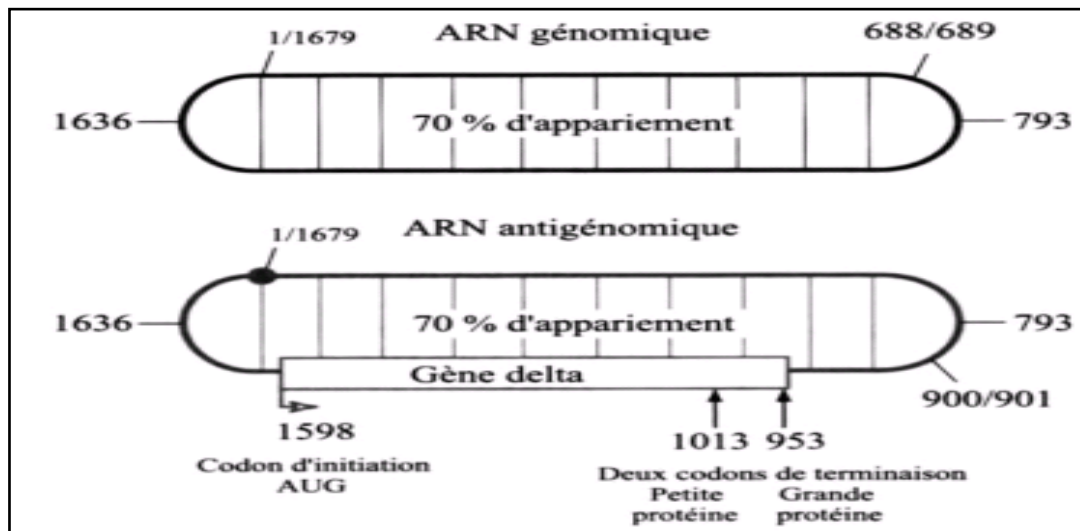


Figure 8 : ARN génomique et antigénomique du VHD (Marcellin et Asselah ; 2008).

I.2.4.3- Génotypes et leur répartition géographique

Le VHD est caractérisé, comme son virus auxiliaire VHB, par une très grande variabilité génétique et une répartition géographique caractéristique. Le genre Delta virus est aujourd'hui classé en 8 génotypes (VHD 1 à 8). VHD-1 est ubiquitaire et retrouvé dans tous les continents. VHD-2 et 4 sont retrouvés en Sibérie, en Asie de l'Est et du Sud, au Japon et aux Îles Miyako. Le VHD-3 a été décrit au nord de l'Amérique du Sud et dans le bassin amazonien. Les génotypes VHD-5, 6, 7 et 8 ont été décrits au Centre national de référence (CNR) chez des patients originaires d'Afrique subsaharienne vivant en France, infectés dans leurs pays d'origine (Gal *et al.*, 2006).

I.2.4.4- Protéines virales

Les deux protéines virales de 24 et 27 kDa s'associent dans la particule virale à l'ARN génomique. Elles portent l'antigénicité delta (Ag VHD). Cet Ag VHD peut être détecté dans le foie ou le sérum des patients ou d'animaux infectés. La protéine SHD (p24) active la

réplication alors que la protéine LHD (p27) réprime la réplication et joue un rôle dans l'assemblage des particules virales (Mansour et al., 2012).

I.2.5- Cycle de réplication du virus de l'hépatite D

La réplication du VHD débute par l'adhérence et la pénétration du virion dans l'hépatocyte grâce à la grande protéine d'enveloppe.

La RNP est transportée du cytoplasme vers le noyau, par l'intermédiaire de l'Ag VHD qui comporte un signal de localisation nucléaire.

La réplication du génome s'effectue par l'ARN polymérase cellulaire de type II.

- Une partie de cet ARN sert d'ARNm et code pour les protéines D.
- Une autre se re-circularise et de nouveaux brins génomiques sont copiés.

La présence de la grande protéine suffit alors à inhiber la réplication virale et assembler les particules infectieuses par une interaction protéines - protéines.

Les ribonucléoprotéine soient alors expulsées hors du noyau. Une interaction spécifique avec les Ag HBs du VHB induirait la sortie du VHD de la cellule (Figure 9) (Mammette, 2002).

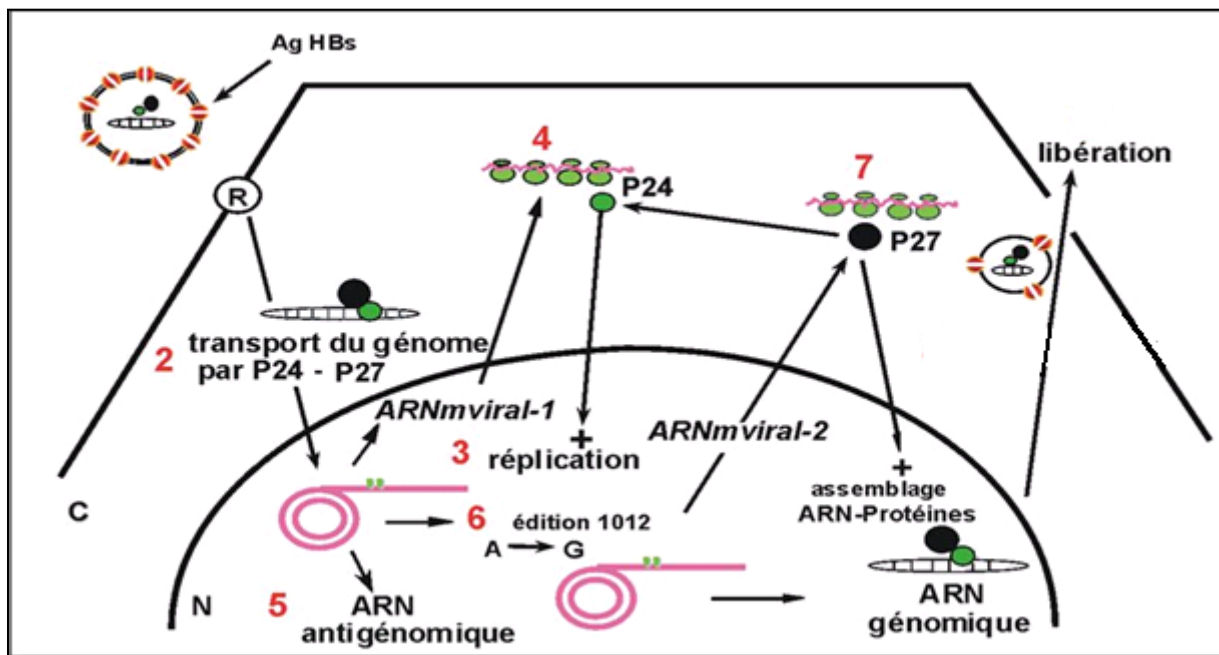


Figure 9 : cycle de réplication du virus de l'hépatite D (Mammette, 2002).

I.3. Pathologie de l'hépatite B et D

I.3.1-Pathologie de l'hépatite B

I.3.1.1- Epidémiologie et mode de transmission

L'hépatite virale B est de loin la plus anciennement connue et la plus étudiée des hépatites (**Lavanchy, 2004**). Elle est due à une infection par le VHB et entraîne une inflammation du foie, se présente sous forme d'hépatite aigüe ou chronique pouvant se compliquer en cirrhose ou carcinome hépatocellulaire (CHC) (**Perscott et al., 2010**).

Le VHB est un virus hautement contagieux. Son réservoir est strictement humain, et il peut résister dans le milieu extérieur pendant plus de 7 jours. La plupart des gens infectés sont porteurs asymptomatiques et jouent un rôle important dans la transmission de la maladie (**Collier et Oxford ; 2004**).

Selon l'OMS, plus de 2 milliards de personnes sont infectées par le VHB, dont plus de 350 millions de personnes ont une infection chronique (**Hoofnagle et al., 2007**). Il est retrouvé en forte concentration dans les produits biologiques : sang, sperme, sécrétions vaginales mais aussi la salive. Ainsi, la transmission est :

- Verticale : maternofoetale, pendant l'accouchement et la période néonatale.
- Horizontale : par voie sanguine, sexuelle ou par contact avec des liquides biologiques infectés (**Perscott et al., 2010**).

La répartition géographique est en adéquation avec le niveau de développement socio-économique. Nous distinguons ainsi :

- Des zones de forte endémie : Afrique subsaharienne, Asie Sud-Est, Chine, certains pays de l'Europe de l'Est.
- Des zones de moyenne endémie : Europe de l'Est, pourtour méditerranéen, Proche-Orient.
- Des zones de faible endémie : Europe de l'Ouest, Australie, Amérique du Nord (**Bonnet et al., 2012**).

I.3.1.2- Signes cliniques

La majorité des personnes atteintes de l'hépatite B n'ont pas de symptômes et ne savent pas qu'elles sont infectées. Quand les symptômes apparaissent, ils sont souvent un signe d'une maladie avancée du foie. Ces derniers peuvent se caractériser par une fièvre, perte d'appétit, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, l'urine foncée, des selles

de couleur grise, des douleurs dans les articulations, la jaunisse et d'autres manifestations (Collier et Oxford ; 2004).

I.3.1.3- Diagnostic

Le diagnostic d'hépatite B est posé sur le bilan de la fonction hépatique. Le bilan initial doit inclure le dosage de la transaminase (ASAT : Aspartate aminotransférase ALAT : Alanine aminotransférase), du gamma GT, phosphatases alcalines, bilirubine totale, libre et conjuguée, taux de prothrombine. Le diagnostic de l'infection à VHB ainsi leur stade évolutif sont déterminés par :

- ✓ Des tests sérologiques dans le but est le dosage des antigènes (HBs et HBe) et des anticorps (anti-HBs, anti-HBe et anti-HBc de type IgM et IgG).
- ✓ Des tests moléculaires permettent de quantifier l'ADN et de suivre l'évolution de la maladie sous traitement. Il peut être réalisé par hybridation de l'ADN viral à des sondes spécifiques, ou par amplification génique de type *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Lunel-Fabiani et al., 2014).

I.3.1.4- Traitement

Le traitement est indiqué dans les hépatites chroniques actives avec réplication virale, afin d'éviter le risque d'évolution vers la cirrhose. Les traitements ont pour but d'arrêter la réplication virale et d'obtenir une séroconversion Ag HBe, anti-HBe puis séroconversion HBs. En Algérie, le traitement de l'hépatite B chronique fait appel actuellement à l'Interféron α (IFN α), pégylé, à l'entécavir, à l'Adéfovirdipivoxil ; quant à la Lamivudine, elle est de moins en moins utilisée parce que les souches circulantes ont développées des résistances (Bordier et al., 2003).

I.3.1.5- Pathogenèse

L'infection par le VHB est à l'origine d'atteintes hépatiques aiguës ou chroniques qui peuvent évoluer vers la cirrhose ou CHC. Le virus n'est pas directement cytopathogène, c'est la réponse immune qui induit les lésions hépatiques chez les patients. Au cours de l'infection par le VHB, les lymphocytes T cytotoxiques (LT_c) induisent l'apoptose des hépatocytes infectés et activent en parallèle une série de réactions inflammatoires dues à la production du facteur de nécrose tumoral (TNF), des radicaux libres, ou des protéases. Ces réactions augmentent la mort hépatocellulaire et aboutissent à l'apparition de foyers d'inflammation nécrotiques dans le foie. Les lésions hépatiques s'accompagnent d'une régénération active des

hépatocytes. Ces deux processus multiplient par 100 le risque de cancer du foie chez les patients infectés (**Ganem et Prince ; 2004**).

I.3.2- Pathologie de l'hépatite D

I.3.2.1- Epidémiologie et mode de transmission

Le virus de l'hépatite delta (VHD) est un virus hépatotrope déficient. Il est dépendant du VHB pour sa réplication, en empreintant son enveloppe. L'infection peut être simultanée, on parle alors de coïnfection, ou peut survenir chez un patient déjà infecté de façon chronique par le VHB, on parle de surinfection (**Bonnet et al., 2012**).

Le virus delta partage les mêmes modes de transmission que le virus B :

- Verticale : maternofoetale.
- Horizontale : par voie sanguine ou sexuelle (**Gaeta et al., 2000**).

La prévalence de l'hépatite delta est estimée à 5% des porteurs chroniques de l'Ag HBs, soit environ 15 millions de sujets dans le monde. Sa répartition géographique est différente de celle du virus B :

- Elevée sur le pourtour méditerranéen, Proche-Orient, Amérique du Sud et Europe de l'Est.
- Rare en Asie, Europe de l'Ouest et Amérique du Nord.
- En France, l'hépatite delta se rencontre surtout chez les patients originaires de régions de forte endémie et, pour les cas autochtones, chez les usagers de drogues intraveineuses (**Rosina et Rizzetto ; 2005**).

I.3.2.2- Diagnostic

Le diagnostic d'hépatite D repose en première intention sur la recherche des anticorps totaux, IgG anti-VHD. En cas de négativité, on peut parler d'absence d'infection delta et en cas de positivité la recherche des IgM anti-VHD est effectuée. L'une des spécificités du VHD est que les anticorps IgM anti-VHD persistent au cours de l'infection chronique. L'antigène delta, n'est pas recherché systématiquement parce qu'il est fugace. L'ARN delta peut également être recherché par PCR (**Lunel-Fabiani et al., 2014**).

I.3.2.3- Traitement

Le traitement de l'hépatite D repose sur : l'IFN α , pégylée pendant au moins 18 mois. Des analogues de nucléotides anti-VHB n'ont pas montré d'efficacité sur le VHD. Ils sont utilisés en fonction de l'évaluation de la maladie VHB sous-jacente. Les taux de guérison sont estimés entre 25% et 40%, les rechutes étant souvent la règle à l'arrêt du traitement (**Bordier et al., 2003**).

I.4. Coinfection VHB-VHD

L'évolution de la coinfection VHB-VHD est similaire à l'infection VHB seule, avec un taux de guérison de 95% et une évolution vers la chronicité dans 5% des cas. Cependant, la coinfection VHB-VHD est responsable d'un taux plus important (17%) d'hépatites fulminantes graves caractérisées par la survenue d'encéphalopathie (**Mboup et al., 2015**).

Ce travail a été mené au niveau du Laboratoire des Virus des Hépatites de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) Annexe de Sidi-Fredj durant une période de 3 mois allant du mois de mars jusqu'au mois de juin 2016. Dans un premier temps, nous avons effectué une étude sérologique puis moléculaire pour la détection des patients porteurs du virus de l'hépatite B et ayant des charges virales élevées; et dans un deuxième temps une autre étude sérologique visant à dépister une éventuelle coinfection VHB-VHD a été réalisée.

II.1-Matériel

II.1.1-Matériel biologique

- **Echantillonnage**

Les prélèvements sanguins ont été effectués soit au niveau du centre de prélèvement de l'annexe de Sidi Fredj, soit acheminés des différentes structures hospitalières du territoire national, selon une fiche technique du laboratoire des Virus des Hépatites accompagnés d'une fiche de renseignement clinique (voir Annexe I).

Le volume de chaque prélèvement est de 5 à 10 ml de sang total prélevés dans des tubes secs ou bien contenant de l'EDTA. Ces derniers sont centrifugés à $1500 \times g$ pendant 15 minutes afin de récupérer le sérum (tube secs) ou le plasma (tube EDTA), Cette étape est importante pour pouvoir séparer les constituants du sang. Ils sont ensuite acheminés au niveau du laboratoire pour subir une analyse sérologique et moléculaire selon la demande.

Les sérums ou plasma étaient analysés le lendemain puis conservés entre $2-8^{\circ} C$ pendant 7 jours ou bien congelés à une température de $-20^{\circ}C$ pendant 6 semaines, voir plusieurs années à $-80^{\circ}C$ selon les besoins.

La recherche des marqueurs du virus delta qui était le principal objectif de notre travail a été réalisé sur 159 prélèvements positifs en antigène de surface (Ag HBs) avec une charge virale (CV) supérieure ou égale à $2 \log UI/ml$.

- **Les anticorps utilisés**

Pour le dosage des antigènes anti-HBs : les anticorps utilisés sont des anticorps monoclonaux de souris ou polyclonaux de chèvre.

Pour le dosage des anticorps anti-VHD : les anticorps utilisés sont des anticorps polyclonaux de cheval.

II.1.2-Matériel non biologique

Les réactifs et appareillages utilisés durant cette étude sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : matériel non biologique pour l'étude sérologique et moléculaire

	Matériel non biologique	
	Réactifs	Appareillage
L'étude sérologique	<p>✓ Automate Ag HBs, Ag HBe, Ac HBc IgG (totaux), Ac HBc IgM, Ac HBe, et Ac HBs.</p> <p>✓ ELISA Coffret Monolisa™ HBs Ag ULTRA. Coffret HDV Ab DIA.PRO.</p>	<p>✓ Automate ARCHITECT PLUS i1000 SR Abbott.</p> <p>✓ ELISA Incubateur, laveur automatique des microplaques, spectrophotomètre et imprimante.</p>
L'étude moléculaire	<p>COBAS^R AmpliPrep/COBAS^R TaqMan^R HBV Test, version 2.0 Analyser Kit.</p>	<p>✓ Automate COBAS^R AmpliPrep/COBAS^R TaqMan^R (Voir Annexe II)</p>

II.2-Méthodes d'analyse

L'objectif principal de notre travail était de déterminer la fréquence de l'hépatite delta chez les patients atteints de l'hépatite B ainsi que l'influence de l'hépatite D sur les variations de la charge virale et sur l'évolution clinique de l'hépatite B en cas de coïnfection VHB-VHD.

Pour se faire nous avons :

- Test sérologique pour l'hépatite B
- Test moléculaire pour l'hépatite B
- Test sérologique pour l'hépatite D

II.2.1-Tests sérologiques

Dans le but de détecter la présence du VHB, Nous avons utilisé deux techniques immunologiques : technique automatisée et technique semi automatique.

Les sérums prélevés sont analysés par l'automate « ARCHITECT ». Trois types de résultats sont possibles :

- Négatif, positif ou bien indéterminé (Figure 10)
 - ✓ Si le résultat est positif, une PCR en temps réel peut être réalisée selon la demande du médecin.
 - ✓ Si le résultat est indéterminé une confirmation est nécessaire. Le test de confirmation de l'Ag HBs se fait par une technique de séroneutralisation par automate ou bien par la technique ELISA.

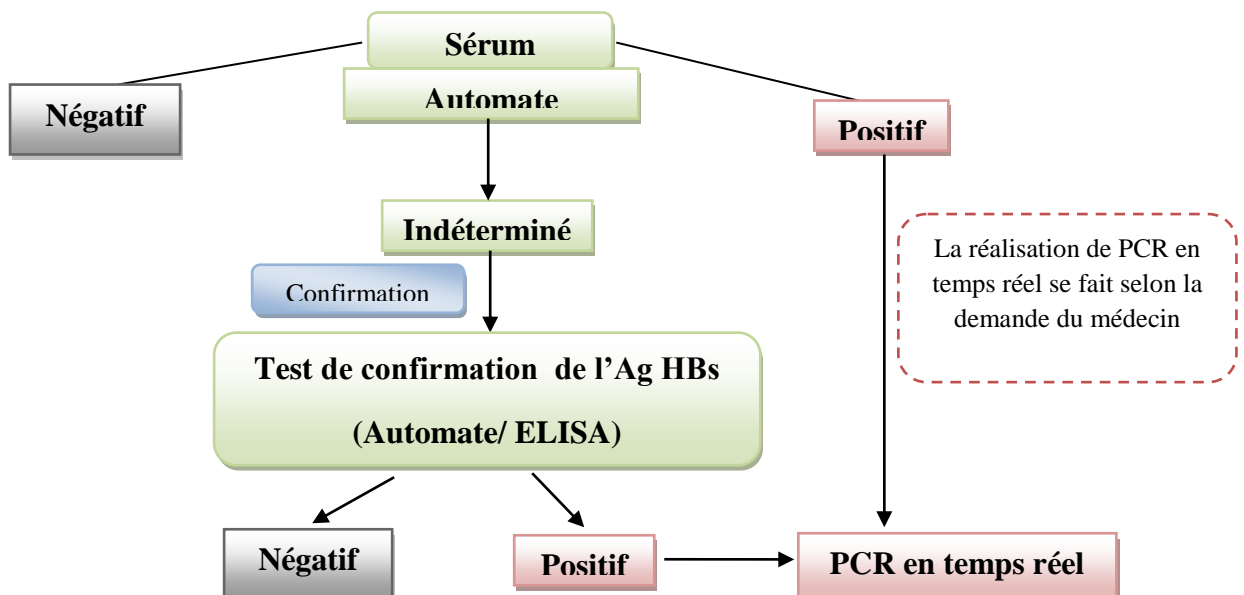


Figure 10 : algorithme de diagnostic

❖ **Technique automatisée**

Le principe de cette technique est basé sur un dosage immunologique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA) sur automate « ARCHITECT » pour la détection qualitative des anticorps dirigés contre l'antigène ou bien mettant en évidence la présence qualitative des antigènes du virus de l'hépatite B.

Le déroulement de cette technique sur l'automate se fait par le dosage des anticorps et des antigènes :

L'antigène (Ag) (HBs ou HBe selon l'analyse) présent dans l'échantillon se lie aux microparticules recouvertes d'anticorps anti- HBs ou anti-HBe et au conjugué d'anticorps anti- HBs ou anti-HBe marqué à l'acridinium.

Après lavages, la réaction chimiluminescente qui en résulte est mesurée en unités relatives de la lumière (URL).

Les anticorps (Ac) (anti-HBs, anti-HBe ou anti-HBc) présents dans l'échantillon se lient aux antigènes (HBs, HBe ou HBc) recombinants présents dans le réactif de neutralisation.

Les antigènes (HBs, HBe ou HBc) recombinants non liés peuvent alors se lier aux microparticules recouvertes d'anticorps (anti-HBs, anti-HBe ou anti-HBc).

Après lavage, le conjugué d'anticorps (anti-HBs, anti-HBe ou anti-HBc) marqué à l'acridinium est ajouté.

Après un autre cycle de lavage, la réaction chimiluminescente résultante est mesurée en unités relatives de la lumière (URL).

❖ **Technique semi-automatique « ELISA »**

Le principe de la technique ELISA « Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay » est une technique immuno-enzymatique basée sur la détection des Ag ou des Ac dans le sérum ou le plasma humain.

Pour le dosage de l'**Ag HBs** par la méthode ELISA de type sandwich, on utilise des Ac monoclonaux et polyclonaux permettant de se lier à l'Ag HBs

La phase solide est sensibilisée par des Ac monoclonaux.

Les conjugués sont basés sur l'utilisation d'Ac monoclonaux de souris ou polyclonaux de chèvre contre l'Ag HBs. Ces anticorps sont couplés à la peroxydase.

Le substrat de la peroxydase contenant de tétra-méthyl benzidine (TMB) permet de révéler la présence de l'Ag HBs (figure 11), après addition de la solution d'arrêt.



Enzyme (peroxydase) + substrat (TMB) = complexe enzymatique = enzyme + produit

Figure 11 : réaction enzymatique

Ce dernier (dosage de l'Ag HBs) se fait selon le mode opératoire suivant :

1. Distribuer 100 µl de contrôle négatif et positif ainsi que les échantillons à analyser dans les cupules de la microplaque (phase solide). Des antigènes HBs sont présents, ils se lient aux anticorps anti-HBs de la phase solide.
2. Ajouter 50 µl de conjugué (anticorps anti-HBs couplés à la peroxydase)
 - ✓ Homogénéiser en aspirant et en faisant ressortir le mélange
 - ✓ Recouvrir la plaque avec un film adhésif et incuber à 37°C pendant 90 minutes.
 - ✓ Après incubation, un lavage est effectué pour éliminer tous ce qui n'est pas fixé.
3. Ajouter 100 µl de solution enzymatique qui assure l'action catalytique de la peroxydase : révélation des anticorps fixés.
 - Recouvrir la plaque avec un couvercle pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
4. Ajouter 100 µl de solution stop afin d'arrêter la réaction.

La lecture des résultats s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre à 450/620nm (Lecture en bio-chromatisme). L'absorbance mesurée par le spectrophotomètre permet de conclure la présence ou l'absence d'Ag HBs

Afin de détecter la présence de l'Ac anti-VHD, nous avons utilisé la méthode ELISA qui se base sur l'utilisation des Ag recombinants permettant de se lier aux anticorps de VHD.

La phase solide est sensibilisée par des Ag recombinants.

Les conjugués sont basés sur l'utilisation d'Ac polyclonaux de cheval. Ces derniers sont couplés à la peroxydase.

Le substrat de la peroxydase contenant le tétra-méthyl benzidine (TMB) permet de révéler la présence d'Ac anti-VHD, après addition de la solution d'arrêt.

Ce dernier (dosage de l'Ac anti VHD) se fait selon le mode opératoire suivant :

- Laisser la première cupule vide
 - Distribuer 100 µl de contrôle négatif, calibrateur et le contrôle positif ainsi que les échantillons à analyser dans les cupules de la microplaque (phase solide). Des anticorps anti-VHD sont présents, ils se lient aux antigènes VHD de la phase solide. Recouvrir la plaque avec un film adhésif et incuber à 37°C pendant 60 minutes.
 - Après incubation, un lavage est effectué pour éliminer tous ce qui n'est pas fixé.
1. Ajouter 100 µl de conjugué (anticorps monoclonaux couplés à la peroxydase) dans toutes les cupules sauf la cupule vide.
 - Recouvrir la plaque avec un film adhésif et incuber à 37°C pendant 60 minutes.
 - Après incubation, un deuxième lavage est effectué pour éliminer tous ce qui n'est pas fixé.
 2. Distribuer 100 µl de solution enzymatique qui assure l'action catalytique de la peroxydase : révélation des anticorps fixés.
 - Recouvrir la plaque avec un couvercle pendant 20 minutes à l'abri de la lumière.
 5. Ajouter 100 µl de solution stop afin d'arrêter la réaction.

La lecture des résultats s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre à 450/620 nm sans le blanc (lecture en bio-chromatisme), l'absorbance mesurée permet de conclure la présence ou l'absence d'Ac anti-VHD.

II.2.2-Test moléculaire

La détection de l'ADN du VHB par **PCR en temps réel** a été effectuée uniquement pour les sérums positifs en Ag HBs et selon la demande du médecin.

C'est un test basé sur l'amplification in vitro de l'acide nucléique (ADN). Il permet la mesure quantitative de l'ADN du VHB dans le sérum humain.

Cette dernière est un test indispensable, utilisé dans le cadre de la surveillance et du suivi thérapeutique des patients.

Elle est basée sur l'utilisation des sondes oligonucléotidiques (sonde TaqMan). Cet oligonucléotide est complémentaire d'une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier situé entre les deux amorces, à son extrémité 5' se trouve un fluorochrome rapporteur et à son extrémité 3' se trouve un groupement quencher. Lorsque le fluorochrome et le quencher sont proches, la fluorescence est absorbée par le quencher suite à des effets de transfert d'énergie.

Il s'agit d'une séparation de fluorochrome de la sonde suite à l'activation de la nucléase 5'-3' de l'ADN polymérase thermostable et l'obtention d'une émission de la fluorescence car le fluorochrome rapporteur s'éloignera de groupement quencher.

L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié au cours de la réaction de PCR. On peut suivre ainsi l'amplification de la séquence cible après chaque cycle, d'où le terme de « PCR en temps réel » (figure 12).

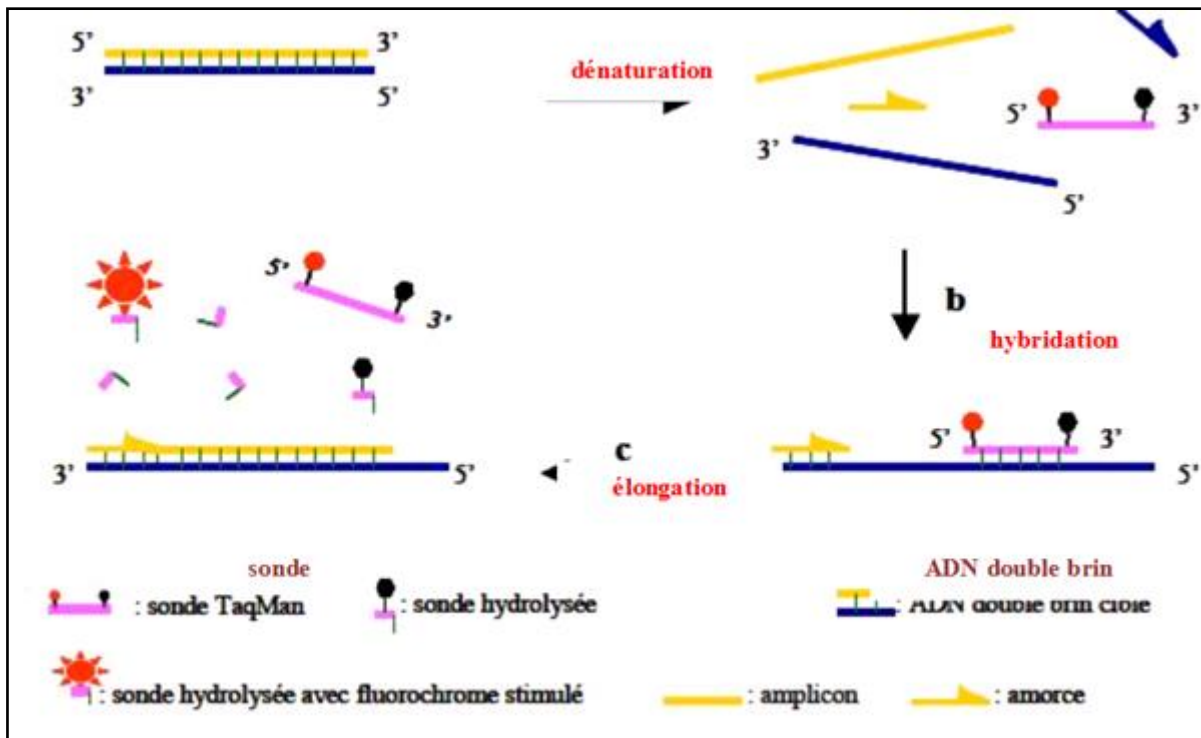


Figure 12: principe de la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan (Elyse et Houde, 2002).

La PCR en temps réel nécessite :

- ✓ Des amorces VHB sens et reverse.
- ✓ Des sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence spécifiques du VHB et du standard de quantification (QS) du VHB.
- ✓ Des oligonucléotides (dNTP) : dATP, dCTP, dGTP, dUTP
- ✓ ADN polymérase Z05 (*Thermus specie*) : enzyme recombinante thermostable.
- ✓ Mn^{2+}
- ✓ Triphosphate de désoxynucléotides (dNTPs)

La réalisation de la PCR en temps réel avec le TaqMan test se fait selon les étapes suivantes :

➤ Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est automatisée et se fait sur l'appareil COBAS AmpliPrep (Extracteur) à l'aide d'une technique générique de capture basée sur silice.

La procédure traite 500 µl de sérum. Elle se déroule comme suit :

- ✓ Ajout d'une quantité connue de molécules d'ADN du contrôle interne (QS) du VHB dans chaque échantillon avec le réactif de lyse et des particules de verre magnétiques.
- ✓ Le tampon de lyse permet de détruire les composants du virus pour l'obtention d'acides nucléique (ADN). Ces derniers sont absorbés et élués à température élevée dans une solution aqueuse.

➤ Amplification par PCR

Le thermocycleur permet d'augmenter la température en dénaturant l'ADN bicaténaire.

Pendant que le mélange refroidit, les amorces s'hybrident à l'ADN cible et l'ADN standard (QS). En présence de Mn^{2+} et d'un excès de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs), l'ADN polymérase, thermostable Z05, allonge les amorces hybridées le long des matrices cibles, ce qui génère une molécule d'ADN bicaténaire appelée amplicon.

L'analyseur répète automatiquement cette opération pendant un nombre de cycle défini, chaque cycle doublant effectivement la quantité d'ADN de l'amplicon.

➤ Interprétation des résultats

A la fin de la PCR, le logiciel AMPLILINK, représente graphiquement les résultats de l'amplification et de quantification, ceux-ci se présentent sous forme de graphe illustrant l'évolution de la cinétique d'accumulation de la fluorescence au cours de cycles d'amplification. L'évolution de cette cinétique prend l'allure d'une courbe sigmoïde (figure 13) ou se distinguent trois phases :

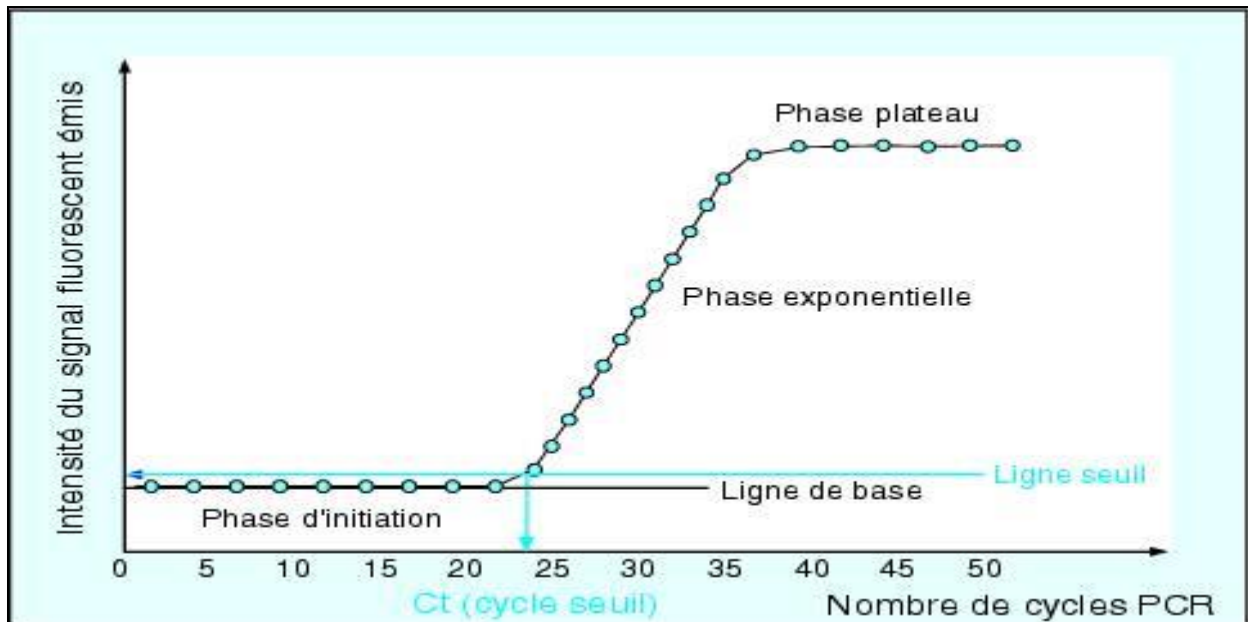


Figure 13: le suivi en temps réel d'une réaction PCR.

- **Phase d'initiation :** la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent.
- **Phase exponentielle :** elle est caractérisée par la visualisation de l'augmentation de la fluorescence ou la quantité de produit de PCR obtenue est directement proportionnelle à l'intensité de fluorescence.
- **Phase plateau (phase saturation) :** certains composants de la réaction deviennent limitant, le système ne permet plus une amplification exponentielle.

II.3- Etude statistique

- Sec Ratio= Nombre des cas masculins / Nombre des cas féminins
- Pourcentage= [Nombre des cas (n) / Nombre total (N)] × 100
- Moyenne = Somme des valeurs / Nombre de valeurs

➤ Ecart-type= $\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$

Afin de vérifier l'influence du virus de l'hépatite D sur les variations de la charge virale et sur l'évolution clinique de l'hépatite B en cas de coïnfection VHB-VHD. Nous avons voulu déterminer la fréquence de l'hépatite delta chez les patients atteints de l'hépatite B. Pour cela, 159 patients connus porteurs du VHB ont été inclus dans cette étude.

III.1- Répartition des cas selon le sexe

Les résultats obtenus pour les 159 prélèvements à Ag HBs positif montrent que 84 d'entre eux sont de sexe masculin avec une fréquence de 52.83 %, alors que 75 soit 47,17 % sont de sexe féminin avec un Sex Ratio de 1.12 (Figure 14).

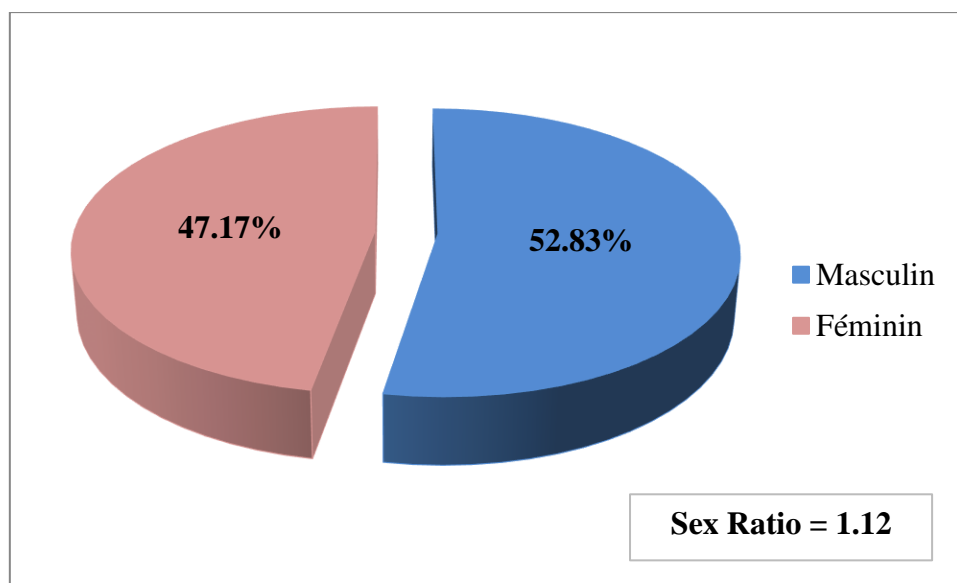


Figure 14 : répartition des patients VHB positif en fonction du sexe.

Sex Ratio = Nombre des cas masculin / Nombre des cas féminins

L'étude de la fréquence de l'Ag HBs selon le sexe a montré une prédominance masculine.

La comparaison de nos résultats aux travaux réalisés par d'autres équipes à l'échelle nationale et internationale est en accord avec nos conclusions et montre bien une prédominance masculine.

En effet, dans une étude réalisée par Berkane en juin 2003 à Alger, portant sur les hépatites virales, on dénombre une série de 126 patients porteurs du virus B, aux quels, on rapporte un Sex-Ratio de 2,07 en faveur du sexe masculin (**Berkane, 2003**).

La prédominance masculine a également été rapportée dans une autre étude, réalisée à l'Est du pays en 2008, portant sur un échantillon de 75 patients, où un Sex-Ratio de 1,7 a été retrouvé (**Khelifa et Thibault ; 2009**).

De même dans une étude rétrospective dirigée par le service d'épidémiologie de Tlemcen, s'étalant sur une période allant de 2001-2009, portant sur 104 patients, le Sex-Ratio était égal à 3,33 (**Benbekhti, 2013**).

De plus, en 2012, Gourari confirme la sur représentation masculine avec un Sex-Ratio de 2,24 (**Gourari, 2012**).

Toutes les études faites dans les pays du Maghreb, relèvent sans exception une prédominance masculine, avec un sex-ratio de 1,35; 1,97 selon **Kitab et al., (2011)** et **SBAI (2012)** au Maroc, et de 2,48 selon **Ben-Alaya et al., (2010)** en Tunisie.

Les données épidémiologiques en France (2008-2012), relèvent également une représentation masculine prédominante de 59% (**Pioche et al., 2014**), au Royaume-Uni de 60,9% (**Richard et al., 2013**) et en Italie de 76,2% (**Leluzzi et al., 2014**).

III.2- Répartition des cas selon l'âge

Les résultats obtenus, nous ont permis de confirmer que toutes les tranches d'âge sont touchées par le VHB, avec un âge moyen et un écart type respectivement de 38.37 ± 14.92 ans. L'ensemble de ces données est illustré dans le tableau II.

Tableau II : répartition des patients VHB positif en fonction de l'âge.

âge	[0-15[[15-30[[30-45[[45-60[[60-75[[75-90[Total
Pourcentage	1.26	28.93	42.77	15.09	9.43	2.52	100
Moyenne	12	24.3695	35.6471	51.7083	65.2666	78	/
Ecart type	0	3.80	4.50	4.38	5.29	3.16	/

Les résultats présentés dans le tableau II et la figure 15 nous montrent que :

La tranche d'âge la plus touchée par VHB pour les deux sexes est la troisième classe 30-45ans avec une fréquence de 42.77 % suivie par la tranche d'âge 15 – 30 ans avec une fréquence de 28.93%. En troisième position c'est la classe 45-60 ans avec une fréquence de 15.09% et enfin la classe des enfants de moins de 15 ans avec une fréquence de 1.26%.

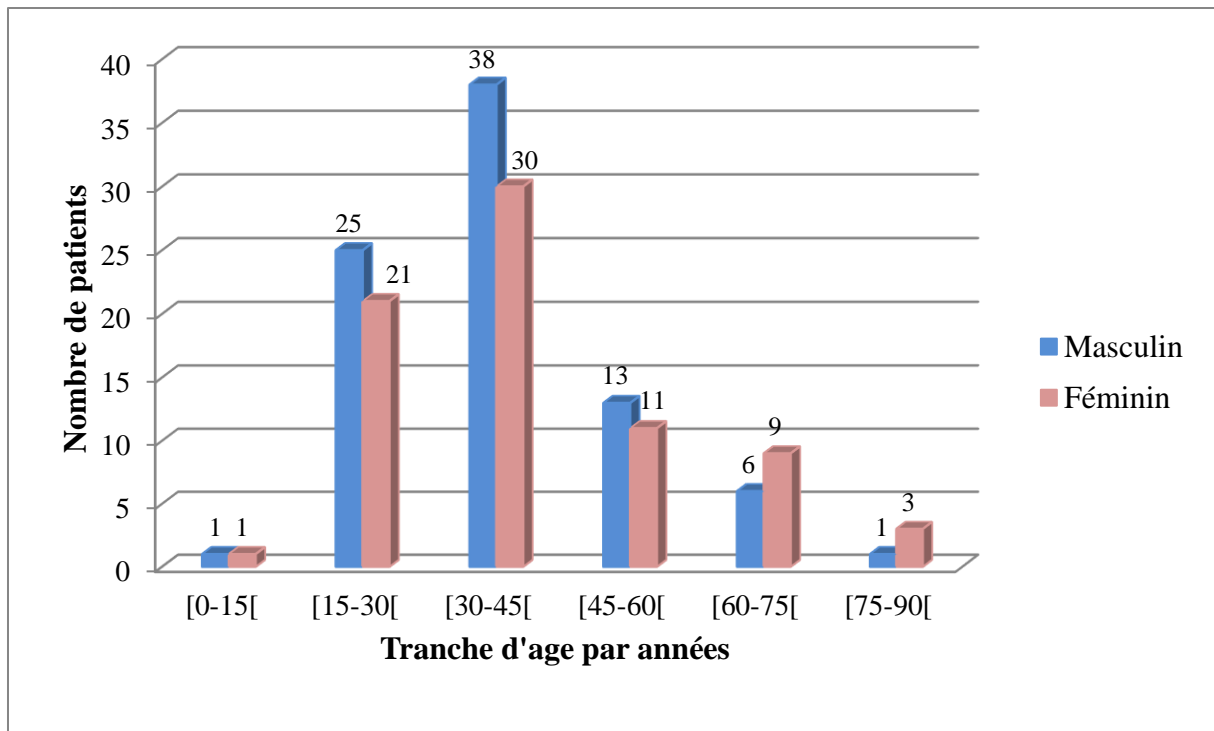


Figure 15 : répartition des patients VHB positif en fonction de l'âge et du sexe.

L'Algérie est un pays d'endémicité intermédiaire (2-8%), selon la classification de l'OMS avec une prévalence de 2,15 selon une enquête nationale réalisée en 1998 (**Khelifa et Thibault ; 2009**).

L'étude comparative menée par **André (2000)**, a révélée que la plupart des pays africains ont une endémicité élevée sauf l'Algérie, le Maroc et la Tunisie qui font partie des zones d'endémicité intermédiaire. Ce taux intermédiaire d'endémicité s'explique probablement par le succès du programme national de vaccination contre le VHB qui aboutira à long terme à une diminution plus importante et on passera alors à un taux faible d'endémicité (<2%) selon l'OMS et pourquoi pas à l'éradication du VHB par la vaccination.

Selon **Ben Amora et al., (2009)**. Les pays Magrébins tels que la Tunisie le Maroc et l'Algérie font partie des pays qui ont adhéré au programme de l'OMS pour la vaccination contre le VHB : la Tunisie depuis 1995, le Maroc depuis 1999 et enfin l'Algérie en 2003.

Différents facteurs de risque permettent la transmission du virus de l'hépatite B, parmi ces facteurs, le comportement sexuel, dont des études ont confirmé la présence de l'Ag HBs dans plusieurs fluides corporels tels que les sécrétions génitales (sécrétions féminines et masculines), ainsi que les sécrétions biliaires et le lait maternel (**Yang et al., 2009**). Ceci

pourrait expliquer probablement la tranche d'âge la plus touchées [30 - 45] qui est en plein activité sexuelle.

Un autre facteur de risque, est l'utilisation de seringues à usage multiple pour l'administration des injections thérapeutiques, ce qui pourrait expliquer les tranche d'âge les plus touchées ; ceci n'est pratiquement plus retrouvé depuis l'utilisation des seringues à usage unique sauf chez les toxicomanes ou ce mode de transmission persiste (**Kao et Chen ; 2002, Chakravarty et al., 2005**) mais qui n'est pas le plus fréquent dans notre pays.

Aussi, le VHB peut survivre sur les surfaces inertes pendant plus d'une semaine, l'exposition indirecte au virus peut se produire par l'intermédiaire d'objets contaminés inanimés. De plus, il existe la transmission intrafamiliale, le risque du partage des objets personnels (rasoirs, coupe-ongles et brosses à dents....). Ce type de transmission horizontale se produit principalement dans les zones de forte endémicité et dans des conditions d'hygiène insuffisantes (**Van der Eijk et al., 2004**).

L'hépatite B peut aussi être transmise via des pratiques thérapeutiques dangereuses, tel que les aiguilles et les instruments médicaux mal stérilisés (**Alter Miriam, 2006**).

Autres sources de transmission probable trouvées dans des études étaient les interventions dentaires. Une association positive entre l'histoire d'un traitement dentaire avec un chirurgien-dentiste non qualifié a été trouvé (**Mast et al., 1999**).

III.3- Répartition des cas selon le profil sérologique de l'hépatite B

Tous les patients sont porteurs de l'Ag HBs avec des profils sérologiques différents (Tableau III).

Tableau III : répartition des patients Ag HBs positif selon leurs profils sérologiques.

	Profils	Nombre de patients
1	Ag HBs + Ag HBe - Ac HBc + Ac HBe +	109
2	Ag HBs + Ag HBe - Ac HBc + Ac HBe-	3
3	Ag HBs + Ag HBe + Ac HBc + Ac HBe - IgM anti HBc +	2
4	Ag HBs + Ag HBe + Ac HBc + Ac HBe - IgM anti HBc -	41
5	Ag HBs + Ag HBe + Ac HBc - Ac HBe - IgM anti HBc -	4
	Total	159

Remarques

- La recherche des **IgM anti HBc** signe l'infection aigue ou la réactivation. Ce marqueur est recherché uniquement pour les patients qui ont l'Ag HBe positif.

Interprétation des différents profils sérologiques du VHB

1. Hépatite à virus sauvage en voie de guérison probable après disparition de l'Ag HBe **ou** hépatite chronique à virus mutant pré-c.
2. Patient en séroconversion « e » avant l'apparition de l'Ac HBe.
3. Hépatite aigue à virus sauvage **ou** réactivation d'une hépatite B à virus sauvage.
4. Hépatite chronique active à virus sauvage.
5. Hépatite aigue précoce à virus sauvage **ou** phase d'immunotolérance.

III.4- Répartition des cas selon l'Ag HBe et la charge virale de l'hépatite B

Selon les résultats de la recherche de l'Ag HBe, les patients sont répartis en deux groupes (Tableau IV):

- ✓ Groupe 1 : 112 patients Ag HBe (-).
- ✓ Groupe 2 : 47 patients Ag HBe (+).

Tableau IV : répartition d'Ag HBe selon la charge virale du VHB.

Marqueur sérologique	Charge virale log UI/ml		Total
	≤4 log UI/ml	>4 log UI/ml	
Ag HBe négatif	87	25	112 (70.44%)
Ag HBe positif	7	40	47 (29.56%)

A partir du tableau IV, nous remarquons que le taux d'Ag HBe négatif est plus élevé que l'Ag HBe positif ce qui permet de dire que l'hépatite B à Ag HBe négatif est prédominante dans notre échantillonnage avec un pourcentage de 70.44%.

En effet, l'infection par le VHB se caractérise par une première phase associée à un Ag HBe positif c'est la phase d'immunotolérance suivie par une seconde phase marquée par la perte de l'Ag HBe qui évolue soit vers la guérison ou bien vers la chronicité et c'est à ce stade que des mutations du génome viral mutant pré core (Pré/c) peuvent apparaître donnant une hépatite à virus mutant ou bien une hépatite B chronique à Ag HBe négatif. Du point de vue virologique, la majorité de nos patients avaient une charge virale basse (≤ 4 log UI/ml) et donc ce sont des hépatites à virus sauvage qui ont perdu l'Ag HBe.

La présence de l'Ag HBe indique une réplication virale active dans les hépatocytes avec un risque élevé de développer un carcinome hépatocellulaire (**Forbi et al., 2012**).

L'hépatite B chronique à Ag HBe négatif compte dans certaines régions pour 50 à 80% du total de la population des patients atteints d'hépatite B chronique (**Funk et al., 2002**).

L'épidémiologie de l'hépatite B chronique à Ag HBe négatif est marquée par une prédominance masculine ce qui est concordant avec notre étude. Les patients sont le plus souvent âgés (en moyenne de 35 ans qui pourrait s'expliquer probablement par une contamination précoce c.à.d. à l'enfance) par rapport à ceux de l'hépatite B chronique à Ag HBe positif. Au niveau virologique, les taux d'ADN VHB sont majoritairement bas (**Zarski et al., 2006, Shao et al., 2007, Lemoine et al., 2013**). Dans les études épidémiologiques disponibles à travers le monde, les taux d'ADN VHB sont bas chez les patients avec une hépatite chronique à Ag HBe négatif (**Rabbi et al., 2008, Dan et al., 2011**).

Dans notre étude, 70,44% des patients avaient un ADN VHB ≤ 4 log UI/ml ce qui concorde avec les résultats rapportés dans la littérature. Le virus n'est pas en réplication et donc les patients sont contaminés probablement par un virus sauvage.

L'hépatite B chronique à Ag HBe négatif est associée au développement de maladies hépatiques plus sévères notamment la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (**Kim et al., 2011, Papatheodoridis et al., 2012, Lemoine et al., 2013**).

III.5- Résultats de la sérologie de l'hépatite D

Après réalisation des tests sérologiques d'hépatite delta à la recherche des anticorps totaux, IgG anti-VHD, les résultats sont négatifs pour les 159 sérums testés. Nous pouvons donc parler d'absence d'infection delta donc absence de coïnfection VHB-VHD.

L'Algérie semble être un pays moins exposé au virus de l'hépatite delta selon un travail de thèse qui a rapporté un taux de 2% (Gourari, 2012).

Le virus delta ne semble donc pas fréquent dans notre pays. L'Algérie est probablement un pays de moyenne endémicité pour l'hépatite B comme les autres pays du Maghreb d'après Sbai *et al.*, (2011).

III.6- Résultats des quantifications d'ADN viral de l'hépatite B

III.6.1- Interprétation des graphes de la PCR en temps réel du VHB

Suite aux étapes d'extraction et d'amplification, l'analyseur COBAS TaqMan détermine automatiquement la concentration en ADN du VHB dans des échantillons plasmatiques. Les résultats sont représentés dans la figure 16 et ils sont affichés sous forme de « graphe » par le logiciel AMPLILINK, en fonction de la quantité d'ADN du VHB mesurée dans chaque échantillon, il est possible d'avoir plusieurs graphes figure 17.

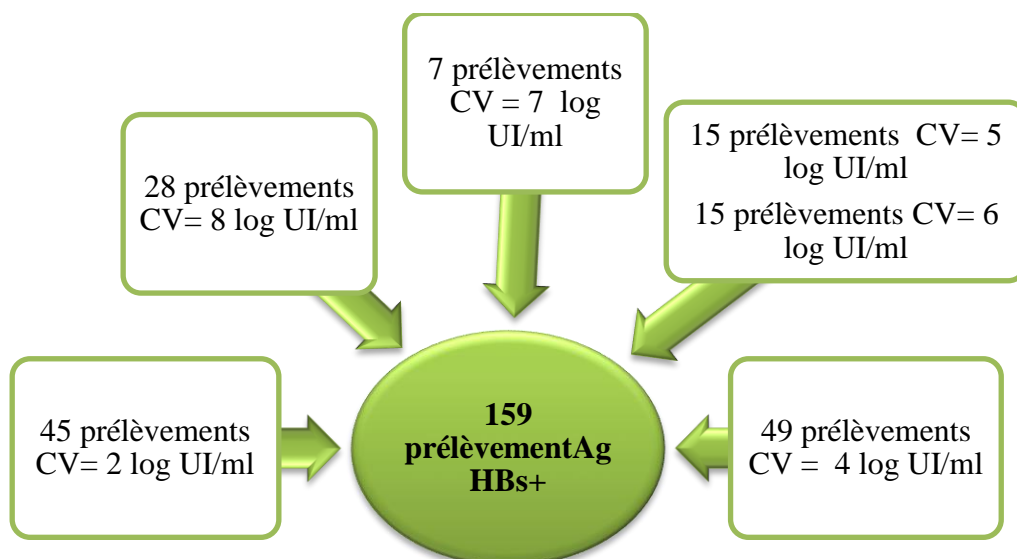


Figure 16 : répartition des prélèvements selon la charge virale de l'hépatite B

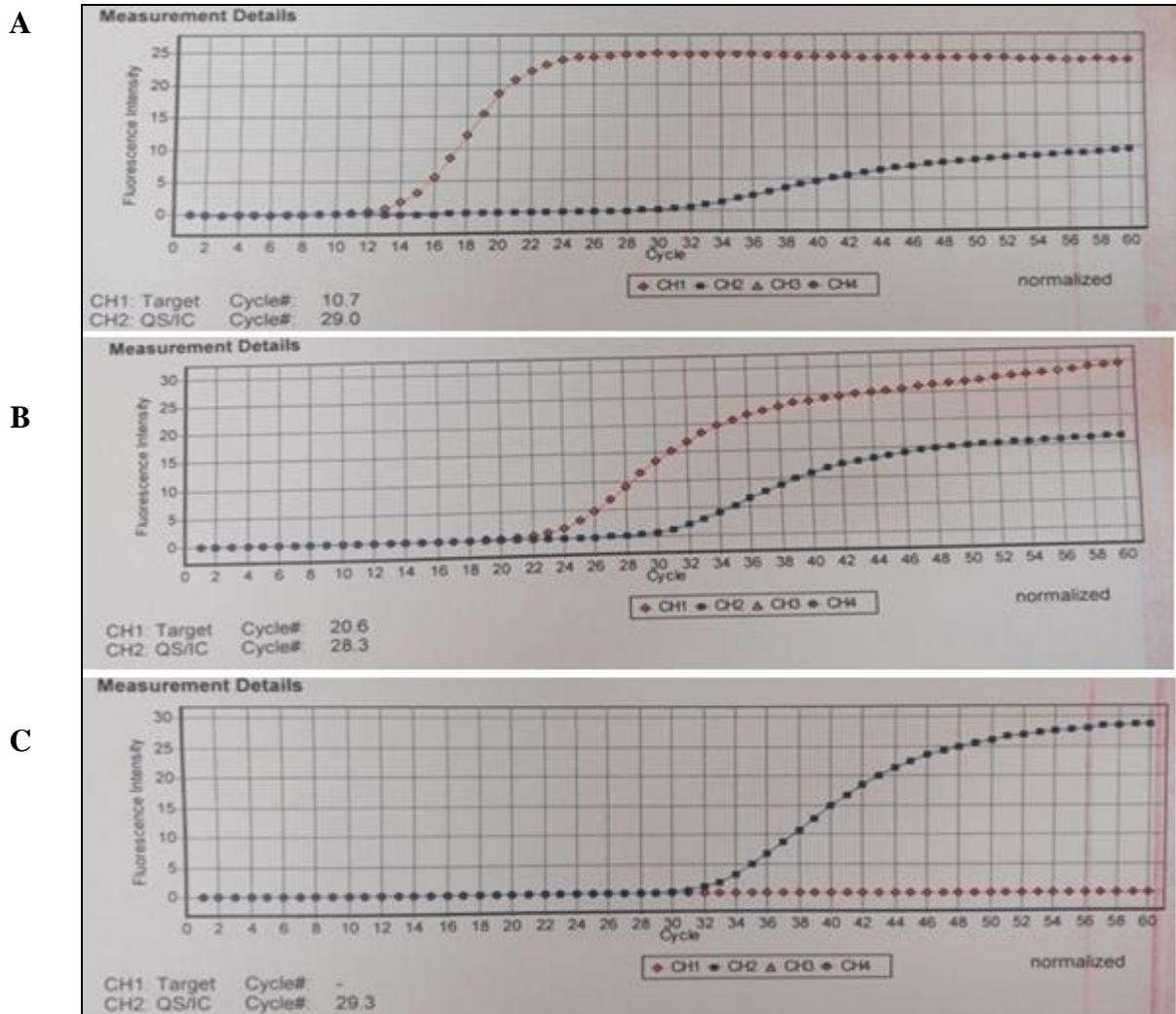


Figure 17: exemple de quantification par l'automate COBAS TaqMan.

A: résultat au dessus du domaine de quantification avec un log de 8.23 UI/ml. **B :** résultat dans le domaine de quantification avec un log de 5.96 UI/ml. **C :** résultat au-dessous du domaine de quantification (ADN non détecté).

Remarque : le domaine de quantification est compris entre [15UI/ml et 6.90×10^7 UI/ml]

La figure 17 représente les différents types de profils susceptibles d'être retrouvés dans les résultats de la quantification. Ceux-ci illustrent la représentation graphique de la cinétique d'accumulation de la fluorescence au cours des cycles d'amplification.

L'évolution de l'amplification de l'ADN viral présent dans l'échantillon plasmatique est représentée par une courbe de couleur rouge, tandis que la courbe de Standard de quantification (QS) ou contrôle interne est de couleur bleue. Les profils obtenus diffèrent en

fonction de la quantité du produit d'origine au début de la réaction de polymérisation en chaîne.

En effet, plus le titre d'ADN- VHB d'un échantillon est élevé, plus tôt la fluorescence du fluorophore rapporteur de la sonde VHB dépasse le niveau de fluorescence de base (Figure 17 A), et inversement. Par contre, la quantité d'ADN du contrôle interne (QS) est constante dans tous les échantillons, la fluorescence du fluorophore rapporteur de la sonde du QS doit apparaître au même cycle pour tous les échantillons.

Les échantillons fortement positifs pour lesquels les valeurs des charges virales calculées sont au-dessus du domaine du test, produisent un résultat invalide dont l'allure correspond à celle représentée par la figure 17 A. Sur cette figure, on remarque que la courbe d'évolution de l'amplification de l'ADN viral démarre très tôt comparée à celle du contrôle interne. Dans ce cas, du fait de l'impossibilité de quantifier la valeur exacte, le logiciel du Cobas TaqMan précise que le cycle seuil (Ct) de l'ADN cible correspond à la valeur 0.

Toutefois, en vue d'obtenir des résultats quantifiables, l'échantillon d'origine doit être dilué dans du plasma humain et l'analyse doit être refaite. Le résultat enregistré lors de cette nouvelle quantification devra alors être multiplié par le coefficient de dilution.

Dans le cas où les valeurs des charges virales calculées se situent dans le domaine linéaire du test, les résultats obtenus auront l'allure de ceux représentés par la figure 17 B. Ainsi, l'intervalle entre les cycles seuils de l'ADN viral et du contrôle interne aura un degré de variabilité relativement faible.

Enfin, la figure 17 C correspond à un résultat de quantification où les valeurs calculées se situent au-dessous de la limite de détection du test 15 UI/ml. Dans ce cas, la quantification est impossible et l'allure de l'évolution de l'amplification de l'ADN viral présent dans l'échantillon est représentée par une droite parallèle à l'axe des abscisses dont la valeur de la fluorescence est restée nulle.

III.6.2- Répartition des cas selon la charge virale de l'hépatite B versus sérologie de l'hépatite delta

A travers les résultats obtenus, nous constatons que parmi un ensemble de 159 patients positifs en Ag HBs avec des charges virales différentes, aucun de ces patients n'est coinfecté par le virus de l'hépatite delta (Figure 18).

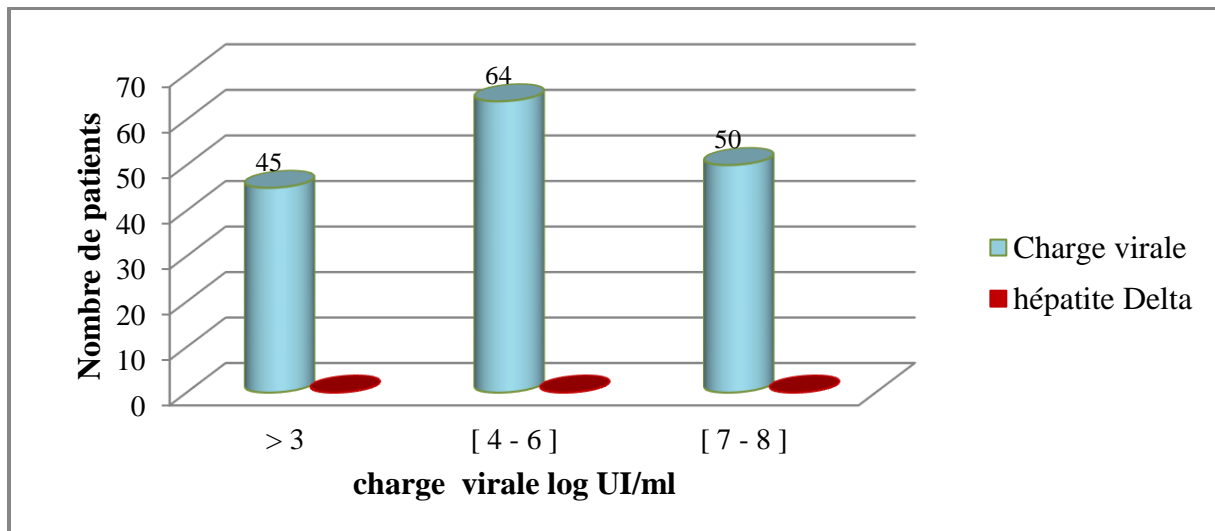


Figure 18 : répartition des patients selon la charge virale de l'hépatite B versus sérologie de l'hépatite delta.

La prévalence et les facteurs de risque d'infection VHD sont étroitement liés à ceux du VHB (**Rizzetto, 1990**). La Tunisie est une zone d'endémicité intermédiaire pour l'hépatite B, mais la prévalence de VHD n'est pas bien connue dans certaines régions du pays (**Triki et al., 1997, Djebbi et al., 2009**).

L'infection par le virus de l'hépatite delta est principalement transmise lors des contacts personnels particulièrement étroits, les membres d'une même famille (**Hassanjani-Roshan et al., 2002**).

La prévalence de la coinfection et de la surinfection VHB / VHD a augmenté au cours de la dernière décennie en Iran, alors que la prévalence de l'hépatite aiguë et chronique D a diminué dans le monde entier (**Karimi et Amini Safieh ; 2000**).

Les individus à haut risque d'infection par le VHD sont les utilisateurs de drogues par voie intraveineuse et les bénéficiaires continus de sang et de produits sanguins, tels que les patients atteints de thalassémie, l'hémophilie, et les carences en facteurs de coagulation, à Ispahan et d'autres régions de l'Iran (**Bakhshipour et al., 2012**).

La prévalence de VHD diffère dans les différentes parties du monde et semble plus élevée en Europe orientale et en Asie occidentale (**Bakhshipour et al., 2012**).

Conclusion et perspectives

Depuis la découverte de l'antigène *Australia* et la particule de Dane, des progrès considérables ont été faits dans la connaissance de la structure des antigènes du VHB et de son génome. La présence de l'Ag HBs reste le marqueur d'une infection au VHB, les autres éléments du diagnostic sont soit des marqueurs de l'infection (anti-HBc IgM), soit des éléments permettant d'apprécier son évolution et son degré de réplication/contagiosité (Ag HBe/anti-HBe), ou encore des molécules permettant de sélectionner les malades à traiter et de les suivre (ADN-VHB).

Une interaction entre le virus de l'hépatite B et le virus de l'hépatite D est une coinfection VHB-VHD causant une aggravation de la maladie hépatique. Cette dernière fait l'objet de notre étude.

Pour notre travail, nous nous sommes intéressés à déterminer la fréquence de l'hépatite D chez les patients atteints de l'hépatite B ainsi que l'influence de l'hépatite D sur les variations de la charge virale et sur l'évolution clinique de l'hépatite B en cas de coinfection VHB-VHD. Pour cela, nous avons utilisé des tests sérologiques (CMIA et ELISA) ainsi qu'un test moléculaire (PCR en temps réel).

A l'issue de notre étude nous avons constaté que malgré la présence du VHB avec des charges virales élevées ($\geq 2 \log \text{ UI/ ml}$), aucun patient n'était coinfecté par le VHD. Après comparaison avec d'autres études réalisées en Algérie, nous avons trouvé une fréquence de 2% (**Gourari, 2012**). A partir des données récoltées dans la littérature et l'ensemble de nos résultats, nous pouvons supposer que l'Algérie est un pays de faible endémicité pour le virus de l'hépatite D et moyenne pour VHB.

En perspective,

Il est important d'élargir cette étude sur un panel plus important et de déterminer la prévalence de cette infection dans notre pays.

Généraliser des centres de biologie moléculaire répartis sur les différentes régions sanitaires du pays.

Il est également primordial de généraliser la vaccination contre l'hépatite B dans les milieux universitaires et collectifs afin de lutter efficacement contre l'infection à hépatite B et d'empêcher sa propagation.



*Conclusion et
perspectives*



Références

bibliographiques



Annese