

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche
Scientifique.

Université de Blida1
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 en
Spécialité : Bio-signalisation cellulaire et moléculaire.

(immunologie)

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Thème

**Etude comparative entre deux méthodes immunologiques
méthode microparticulaire (deuxième génération) et Elisa
sandwich(troisième génération) pour le diagnostic de
l'hépatite B chez une population adulte**

Présenté par :

Fodil hadjala wahiba

Devant le jury composé de :

<i>Mme Benazouz .F</i>	U. Blida 1	M A A	Présidence
<i>Mme. Kanane . A</i>	U. Blida 1	M A A	promotrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2013-2014

Remerciement

Je remercie le tout puissant de m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail .

Puissent tous ceux qui m'ont aidé à réaliser cette étude trouver entre les lignes de ce document , ma gratitude ,ma profonde sympathie aussi que mes remerciement les plus distingués .

A Madame Kanane .A qui a bien voulu diriger mon travail , pour ce encouragement , je le remercie bien vivement .

A Madame Benazouz . F qui ma fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury , quelle trouve ici l'expression de mon profond respect .

A Madame Harkhet .S d'avoir accepter d'examiner ce travail , sa présence au jury ajoute a l'honneur qu'elle me fait quelle trouve ici l'expression de mes sincères remerciement .

Je ne peut oublier le personnel du laboratoire d' immunologie le l'hopital Ibrahim Ibn Techerin (Blida) pour leur aide et leur encouragement afin de réaliser ce travail .

DEDICACES

Je dédie ce mémoire

A mon cher père et ma très chère mère

En témoignage de mes sincère remerciement pour leur, sacrifice et leurs conseil.

A ma chère grand-mère

A mes oncles et tous mes frères et sœurs pour leurs aides encouragements

A ma promotrice kanane " A " pour ces conseils etces encouragements

A tous mes amies et mes connaissances .

WAHIBA

Résumé :

L'hépatite virale B est une maladie infectieuse sévère, parfois mortelle au stade de chronicité et qui atteint le foie, transmise essentiellement par voie sexuelle ou par le sang.

Cette étude consiste à réaliser des tests immunologiques basés sur un système d'agglutination Ac-Ag, pour la détection des antigènes HBs à partir du sérum humain, afin de permettre une étude sérologique comparative entre deux méthodes : - Méthode immuno-enzymatique microparticulaire sur AxSYM (deuxième génération)

Méthode, Elisa sandwich (troisième génération) au niveau de l'hôpital Ibrahim ibn Techirine (Blida).

D'après les résultats obtenus, le test Elisa automatisé sur AxSYM sert à diminuer le plus possible le risque d'erreurs, d'autre part, il donne une grande spécificité et précision des résultats, alors que la méthode sandwich révèle un nombre significativement important de tests douteux, d'où la difficulté de l'interprétation.

Ainsi s'avère que la méthode immuno-enzymatique microparticulaire est plus fiable malgré que l'Elisa sandwich est plus simple.

Mots clés : Méthode immuno-enzymatique microparticulaire, Elisa sandwich-, Hépatite B, HBs

Abstract :

Virale hepatitis B diseases infection sévère, sometimes fatal stage of chronicity, and réaching the liver, transmitted primarily through sexual contact or sang

Our work consists in carrying out immunological based on a system of agglutination Ac-Ag for the detection of the HBs, in order to allow us a comparative serologic study between two method immuno-enzymatic method microparticular ,automated ELISA (AxSYM) and Sandwich ELISA.

According to our results we found that automated tests ELISA are used to decrease the risk of error as much as possible , in addition it give precition to the results .Whereas , the method sanduitch on strips gave us several doubtful cases, form where the diffculty of interpretation

Lastly, it is deduced that method microparticular are most reliabl , although the sandwich Elisa tests are simple .

Key words : Automated Elisa , Sandwich Elisa , Hépatit B , HBs .

الملخص

التهاب الكبد الفيروسي ب هو مرض معد خطير و قد يكون قاتل في مراحله المزمنة وهو ينتقل غالبا عن طريق العلاقات الجنسية أو عن طريق الدم

هذه الدراسة تهدف إلى إجراء اختبارات مناعية تركز على نظام نظام التصاق بين جسم مضاد و جسم غريب لكشف الفيروس التهاب الكبد ب الموجود في مصل إنساني .

هذا العمل يسمح بالقيام بمقارنة مصلية بين الطريقتين الطريقة الآلية اكسيم و اليزا من الجيل الثالث و ذلك لاستنتاج الطريقة الأكثر دقة . إجراء هذه الدراسة تكون على مستوى مستشفى ابن تشيرين بالبلدية

النتائج المتحصل عليها بينت أن اختبارات الآلة اكسيم تهدف إلى تقليل فرص الخطأ و تقديم نتائج دقيقة وفي نفس الوقت اختبارات اليزا من الجيل الثالث قدمت لنا نتائج مشكوك فيها بحيث يكون تفسيرها صعب

أخيرا نستطيع الاستنتاج إن الطريقة الآلية هي الطريقة المثلى لتشخيص التهاب الكبد الفيروسي رغم أن اليزا من الجيل الثالث جد بسيطة .

الكلمات الأساسية الطريقة الآلية . اليزا الجيل الثالث . التهاب الكبد ب فيروس الكبد ب

Liste des Abréviation :

Anti-HBc : Anticorps dirigé contre la protéine core du virus de l'hépatite B .

Anti-HBe ; Anticorps dirigé contre la protéine E du virus de l'hépatite B.

Anti-HBs : Anticorps dirigé contre la protéine de surface du virus de l'hépatite .

ADN : Acide désoxyribonucléique .

Ag HBe : Protéine « pécore »

Ag HBs : Antigène de surface .

CHC : Carcinome Hépatocellulaire .

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay .

VHB: Virus de l'hépatite B .

OMS : Organisation Mondiale de la Sante .

WHO: World Health Organization .

Ag : Antigène .

L : (L = large) : Grande protéine du VHB .

M : (M = médium) : Protéine moyenne du VHB .

S : (S = Small) :Petite protéine du VHB .

ARNm : ARN messenger

GLOSSAIRE :

l'AxSYM est un automate d'immunoanalyse, destiné à traiter une activité comprise entre 60 et 200 immunodosages par jour, avec un panel de tests particulièrement important (plus de 77 paramètres). **(Rubin,1979)**

Dépistage : c'est un examen dont l'objectif est d'identifier rapidement une maladie ou une anomalie et si possible, à un stade précoce. **(Tebbal et al ,1998)**

Prévalence : c'est la proportion d'un nombre de cas d' une maladie observée à un instant donnée rapportée à la population dont sont issus ces cas. C'est un indicateur statique de morbidité plus volontiers utilisé dans l'étude des maladies chroniques **(Tebbal et al ,1998)**.

Ictère : Symptôme qui se traduit cliniquement par la coloration jaune

des muqueuses et des téguments . **(Hauraux et al , 2003)**

cirrhose : est une maladie histologique diffuse du foie, caractérisée par une fibrose cicatricielle ,désorganisantl'architecture lobulaire normale et entraînant la formation de nodules. **(Hauraux et al , 2003)**

Liste des Figures :

Figure	Titre	Page
01	Structure moléculaire de VHB	2
02	cycle virale de VHB	4
03	Situation dans le monde de l'hépatite B	5
04	Cinétique des marqueurs virologique au cours d'une hépatite aigue	7
05	Schématisation des événements associés aux différentes phases d'une infection chronique par le VHB	9
06	Evolution des différents marqueurs viraux au cour de l'hépatite chronique B	11
07	Sérologie de VHB par la méthode microparticulaire AxSYM	23
08	Répartition de VHB selon l'âge	24
09	Répartition de HBV selon le sexe	24
10	Sérologie de VHB par la méthode sandwich	25
11	Répartition de VHB selon l'âge .	26
12	Répartition de HBV selon le sexe	26
13	tube hépariné contient le sang	Annexe2
14	tube hépariné contient le sérum	Annexe2
15	appareillage de l'automate l'AXSYM	Annexe2
16	L'unité d'échantillonnage	Annexe2
17	Incubateur et laveur Elisa	Annexe3
18	Lecteur Elisa	Annexe3

Liste des Tableau :

Tableau	Titre	Page
01	Le diagnostic virologique	12
02	Les principales caractéristiques des Elisa sandwich et technique microparticulaire	15
03	Résultats de dépistage de l'hépatite B par les deux méthodes	Annexe 4

SOMMAIRE

Introduction

Chapitre I : Etude bibliographique .

I)-Hépatite B

I-1)-Définition	1
I-2)-Classification.....	1
I-3)-Organisation génétique	2
I-4)-Multiplication du Virus.....	3
I-5)-Assemblage et sécrétion des particules virales.....	3
I-6)-Epidémiologie de l'hépatite B	4
I-7)-Marqueurs et l'hépatiteB	
I-7-1)-Hépatite Aigue	5
a)-Hépatite B aigue sévère	6
b)-Hépatite fulminante.....	6
I-7-2)-Hépatite B Chronique	6
I-8)- la transmission de l'hepatite B.....	8
I-9)-Pathogénèse	8
I-10)-Diagnostic	
I-10-1)-Diagnostic clinique.....	9
I-10-2)-Diagnostic virologique	9
a)-ADN Virale	9
B)-les antigènes Viraux	9
I-11)-prévention de l'hépatite B.....	12
I-12)-Traitement.....	13
I-12-1)-Thérapie à base d'interféron	13
I-12-2)-Inhibiteur de la polymérase.....	13

I-12-3)-Transplantation hépatique.....	14
--	----

Chapitre II : MATERIEL ET METHODE

II-1-prélèvement.....	17
II-2-préparation du sérum ou plasma.....	17
II-3-Diagnostic sérologique.....	17
II-3-1- Méthode immunoenzymatique microparticulaire sur AxSYM	
a)- Matériels.....	17
b)-Principe	19
c)-Mode opératoire	19
d)-Lecteur.....	20
II-3-2-Méthode immunoenzymatique Elisa sandwich.	
a)-Matériels	21
b)-principe	22
c)-Mode opératoire	22
d)-Lecteur.....	23

Chapitre III : Résultats et discussion

III-1- Résultats

III -1-1-Elisa microparticulaire sur AxSYM (deuxième génération)	
III-1-1-1- Sérologie de la population étudiée.....	25
III-1-1-2-Répartition de VHB selon l'âge.....	26
III-1-1-3-Répartition de HBV selon le sexe.....	26
III -1-2- Elisa sandwich (troisième génération)	
III -1-2-1- Sérologie de la population étudié.....	27
III -1-2-2-Répartition de VHB selon l'âge.....	28
III -1-2-3Répartition de HBV selon le sexe	28

III-2-Discussion

III-2-1-Sérologie de la population étudié.....	29
--	----

III-2-2-Répartition de HBs positif selon l'âge	30
III-2-2-Répartition de séropositifs selon le sexe.....	30

Annexes.

Références.

Introduction :

Les maladies en générale constituent un problème public , mais celles virales sont aucun doute les plus grave . l'hépatite B occupe une place prépondérante, C'est une maladie infectieuse sévère , parfois mortelle au stade d chronicité et qui atteint le foie, transmise essentiellement par voie sexuelle ou par le sang

L'hépatite B provoquerait plus de 600 000 décès par an dans le monde (Goldstein et al, 2005). On estime à 2 milliards le nombre de personnes touchées par cette maladie, dont plus de 350 millions sont des porteurs chroniques capables de transmettre le virus pendant des années (WHO, 2002)

En effet l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que plus de 2 milliards de personnes ont été infectées par l'hépatite B au cours de leur vie, soit environ 30% de la population mondiale. Le virus de l'hépatite B (VHB) est 50 à 100 fois plus contaminant que le VIH (OMS, 2001).

D'autre part la meilleure moyen de lutte contre ces maladies reste indéniablement .un dépistage systématique, pour cela plusieurs méthodes plus ou moins fiable sont utilisées, entre outre , la méthode immunoenzymatique microparticulaire ou automatisée(deuxième génération) et la méthode Elisa sandwich (troisième génération) . C'est dans ce contexte que s'incère que cette étude dont les objectifs sont :

La recherche des antigènes HBs par la technique classique automatisée .

La recherche des antigènes HBs par la technique Elisa sandwich .

Faire une comparaison sérologique pour savoir la méthode la plus fiable entre eux pour la détection des antigènes.

Chapitre I

Etude bibliographique

I-HEPATITE B :

I-1) Définition :

Les hépatites sont des lésions inflammatoire du foie dont les causes peuvent être multiple : infectieuses, médicamenteuses , auto immunes , ect .

Quelle que soit l'origine de la pathologie, des signes cliniques commun peuvent être observés tels que ictère fébriles, décoloration des selles , brunissement des urines et augmentation de la concentration en transaminases dans le plasma , cytolysse et d'une dysfonctionnement hépatique . **(Laurenceau et Marcellin, 1998).**

Cinque Virus ayant un tropisme hépatique quasi exclusif sont responsable de ce qui est communément appelé : hépatites virales ce sont les virus dit de l'hépatite G à été caractérisé sans que son implication dans des pathologies hépatiques soit établie .

Dans le cas des hépatites d'origines virales , les lésions peuvent être due à l'effet cytopathique direct du virus cependant , la majorité des virus des hépatites sont peu cytopathogènes et c'est la réaction immunitaire dirigée contre les cellules hépatiques infectées qui les détruit. **(Laurenceau et Marcellin, 1998).**

I-2) classification et structure du virus de l'hépatite B :

Le virus de l'hépatite B (VHB) (figure n°1) appartient à la famille des hépadnavirus ,de genre Orthohépadnavirus .

La particule virale complète ,appelé la particule de DANE de 42nm , composé d'une enveloppe lipoprotéique , portant le principale marqueur sérique d'infection , l'antigène HBs (s : pour la surface) . une nucléocapside centrale ou core de 27nm de diamètre renferme le génome virale (ADN) et ADN polymérase , il port la spécificité antigénique HBc (c pour la capsid), ne passe pas sous cette forme dans le sérum mais s'y trouve excrétés sous une forme tronquée qui est l'antigène HBe , sa présence témoignant une infection active. Au niveau de l'Ag HBs s'ajoutent des déterminants spécifique de se types diversement associés : Adw , adr ,aym ,ayr , pour les plus fréquents .

le sérum d'un sujet infecté par le VHB peut contenir :

-Des particules de DANE sphériques , infectieuses

-Des particules de 22nm se présentant sous de l'enveloppe du virus

(Stanislas , 1996)

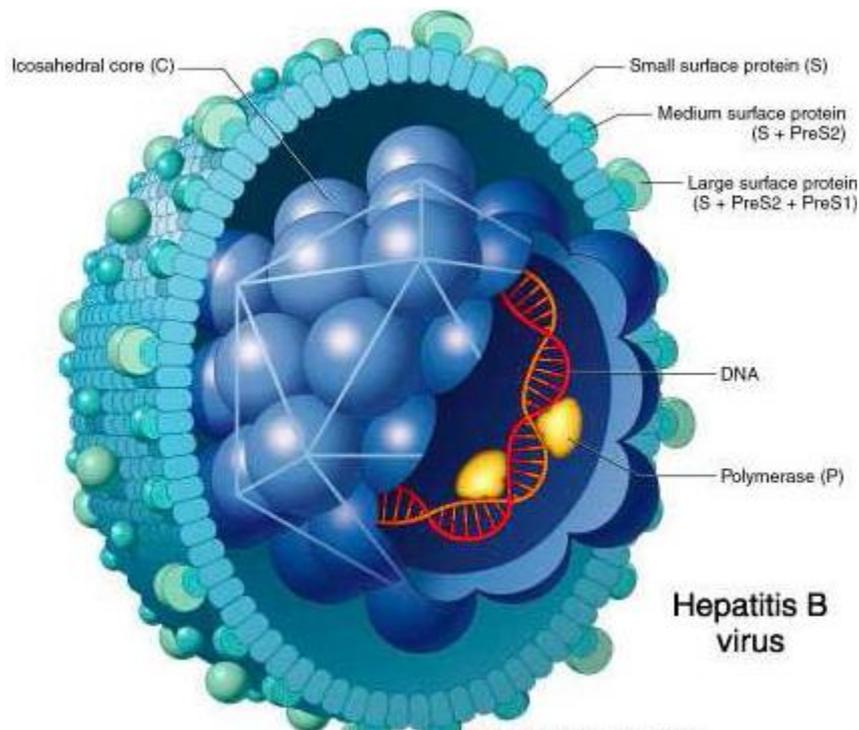


Figure 1 : Structure moléculaire de VHB (Debzi, 2005 et Catrice,2009)

I-3)-Organisation génétique :

Le génome du VHB est un ADN circulaire bi caténaire sur deux trières de sa longueur seulement .il possède donc un brin long L(-) et un brin court (+), le génome est constitué de 23000nucléotides (3.2Kb) , il extrêmement compact , comportant 4phases ouvertes de lecteur (ORF) ,qui chevauchent dans la même orientation transformationnelle :

-Le gène pré S/S codant les trois protéines de surface S pour la petite protéine , préS2/S pour la protéine moyenne et préS1/préS2/S pour la grande protéine (l'AgHBs) .

-Le gène préC/C code les antigènes HBc et HBe

-Le gène p code la polymérase virale , formée de trois domaines , fonctionnels :

-Le domaine N-terminale de la protéine est lié à la partie 5' du brin (-) d'ADN ,il sert d'amorce à l'initiation de la synthèse de ce brin négatif (primase)

Par ailleurs , Une région intermédiaire non essentielle ou espaceur (spacer) dont la taille et repliement permettent une interaction des différents domaines avec le génome virale .

- Un domaine pour la transcriptase inverse /ADN polymérase et un pour l'ARNase H .tous deux ont une homologie avec les domaines correspondants de la transcriptase inverse des rétrovirus .

-Le gène X code la protéine X qui a une fonction transactivatrice sur les promoteurs de l'ADN de l'HBV et sur des promoteurs du génome de l'hôte. **(Hauraux et al , 2003)**

I-4)-Multiplication du virus :

Le virus de l'hépatite B a pour cible principale d'hépatocyte au sein duquel il peut se répliquer , mais il peut aussi se multiplier dans les lymphocytes . pour infecter les cellules d'hépatocytes. Le VHB utilise un récepteur cellulaire qui n'est pas identifié avec certitude, il se lie au différentes protéines d'enveloppe du virus (HBs , préS2 et /ou S1)

Après décapsidation dans le cytoplasme, le génome pénètre dans le noyau de la cellule, le brin (+) de longueur variable est complété , c qui donne naissance à un ADN bicaténaire circulaire , c'est le cccDNA pour(covalently closed circular DNA). La transcription est initiée dans le noyau est produit à partir du brin (-) , un ARN pré-génomique de 3.5 kb et des ARN Messagers s-génomiques de 2.4 ,2.1 et 0.5kb qui codent les protéines de capsid , d'enveloppe préS2-S , préS1 , préS2-S et aussi p et x après encapsidation de l'ARN pré-génomique dans le cytoplasme .

La transcriptase inverse virale produit un brin d'ADN(-) qui sert la matrice pour la synthèse partielle du brin (+) , alors que l'activité Rnase H de la polymérase dégrade l'ARN pré-génomique . Ces étapes précèdent l'acquisition de l'enveloppe au niveau du réticulum endoplasmique, avec sortie de la cellule par bourgeonnement. les mécanismes précis de la réplication virale ne sont pas encore tous compris.

L'implication d'une enzyme de type transcriptase inverse , peut faire comparer la ré-lication des hépanavirus à celle des rétrovirus . Ce mode de réplication est à l'origine d' un taux de mutation plus élevé que celui rencontré dans la réplication des virus à ADN et jouerait un rôle dans l'apparition de VHB variant .

(Huraus et al , 2003) .

I-5-Assemblage et sécrétion des particules virales :

le réticulum endoplasmique (RE), correspondant au site de maturation des trois protéines d'enveloppe L, M et S. Seules les protéines L et S sont indispensables à la sécrétion des particules infectieuses **(Bruss et Ganem , 1991).**

Les virions sont assemblés par regroupement des protéines S majoritaires et le bourgeonnement s'effectue à l'intérieur des compartiments

intermédiaires.

Les particules virales sont transportées jusqu'à l'appareil de Golgi où se produit la glycosylation des protéines de l'enveloppe.

Certaines nucléocapsides ne sont pas enveloppées et retournent dans le noyau où elles sont désassemblées entraînant la libération du génome viral et redémarrage d'un nouveau cycle de multiplication .(Diot et al, 1992)

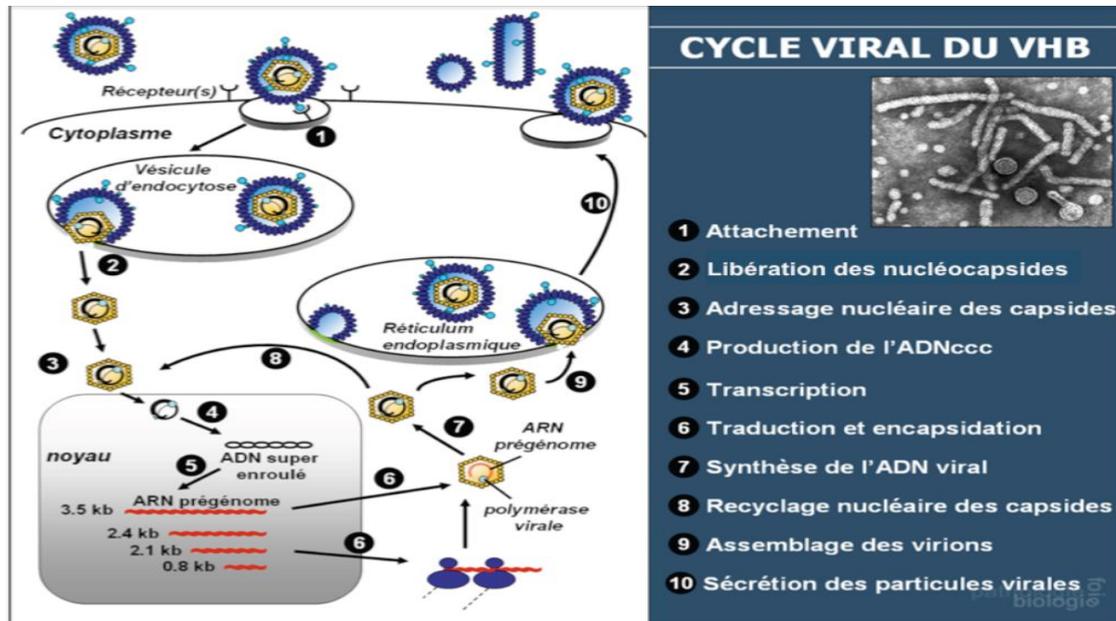


Figure 02 : cycle virale de VHB . (Diot et al, 1992)

I-6) –Epidimiologie de L'hépatite B :

L'hépatite B chronique est une des affections les plus répandues dans le monde. Elle touche 5 % de la population mondiale soit 360 millions de personnes. La prévalence de l'infection est très inégale. Elle varie de 0,1 % à 20 % selon les 3 zones géographiques de l'organisation mondiale de la sante, avec des modes de transmission et des niveaux de risque différents . (WHO ,2002)

En Algérie :

Jusqu'en 1998, seules des données d'études parcellaires étaient disponibles. Il s'agissait essentiellement d'études ciblant des populations bien déterminées a savoir les donneurs de sang, les hémodialyses et les femmes enceintes .

L'enquête nationale sérologique initiée par l'institut national de santé publique (INSP) et l'institut pasteur d'Algérie (IPA) en novembre 1998 sur un échantillon de 8126 personnes représentatif de la population Algérienne a retrouve un taux de prévalence de 2,15 % confirmant ainsi le classement de l'Algérie dans la catégorie des pays de moyenne endémicité (prévalence se situant entre 2 % et 8 %). (Tebbal et al ,1998)



Hépatite B

Selon OMS 2008 (ITH 2011)

■ Pays ou territoires présentant un risque d'infection moyen à élevé
 Risque d'infection toutefois dépendant du comportement !

Figure 3 : Situation dans le monde de l'hépatite B (OMS,2008).

I-7-)-Marqueurs de l'hépatite B

I-7-1)-Hépatite aigue :

Dans les formes symptomatiques (qui représentent que 10% des cas) ,après une période d'incubation de 10 semaines en moyenne ,suivie d'une phase pré-ictérique de 7 jours environ , survient la phase ictérique .

En effet les examens virologique permettent d'affirmer le diagnostic d'hépatite aigue B sont :

- les antigènes HBs (qui peut être détecté 3 semaines environ avant les signes clinique) sont présent dans le sérum , ainsi que les anticorps anti-HBc de type IgM(les plus précoces) présents à un titre élevé .

- les anticorps anti-HBc de type IgM peuvent dans certains cas être seuls présents lorsque l'antigène HBs a déjà disparu du sérum ,ce qui se produit dans 10% des cas environ .(Figure4)

L'évolution est marquée dans plus de 90% des cas par une disparition rapide de l'antigène HBs ,puis par l'apparition d'anticorps anti-HBs neutralisants qui apportent une immunité définitive .Parallèlement , les transaminases sériques se normalisent .

Les anticorps anti-HBc de type IgM disparaissent et seuls vont persister les anticorps anti-HBs et anti-HBc IgG .

Le taux de ces anticorps diminue lentement et après de nombreuses années il ne subsiste qu'un anticorps anti-HBs ou anti-HBc. Ce profil sérologique est celui d'une infection par le virus de l'hépatite B, ancienne et guérie.

(Laurenceau et Marcellin, 1998).

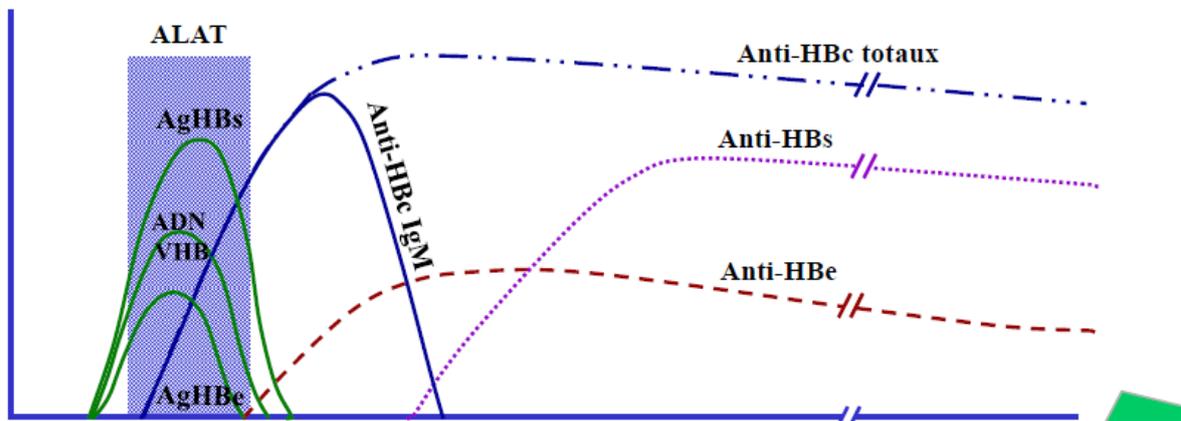


figure 04: Cinétique des marqueurs virologiques au cours d'une hépatite aiguë. (Huraux et al, 2003).

a)-Hépatite aiguë sévère:

elle est caractérisée biologiquement par la diminution du taux de prothrombine (inférieure à 50%) et doit conduire à une hospitalisation rapide en milieu spécialisé pour surveillance. **(Huraux et al, 2003)**

b)-Hépatite fulminante :

Elle est toujours précédée d'une phase d'hépatite aiguë sévère. Elle est marquée biologiquement par un taux de prothrombine inférieur à 50%. La présence d'IgM anti-HBc à un titre élevé est quasi constante. En revanche Ag HBs, Ac anti-HBs et ADN de l'HBV Y sont inconstamment trouvés. **(Huraux et al, 2003)**

I-7-2)-Hépatite B chronique :

Elle est définie par un portage d'antigène HBs supérieure à 6 mois après l'épisode d'hépatite aiguë. L'infection se présente sous des formes variables, allant du portage asymptomatique de l'antigène HBs à l'hépatite chronique, la cirrhose, voire le carcinome hépatocellulaire (figure 5). **(Huraux et al, 2003)**

La phase de tolérance, est caractérisée par la présence d'AgHBe et par une charge virale élevée qui n'induit pas de souffrance hépatique comme en témoigne un niveau normal des transaminases.

Durant cette phase, la virémie très élevée rend les malades extrêmement contagieux. **Liaw et Chu ,2009).**

Durant la phase immunitaire active, toujours caractérisée par la présence d'AgHBe, la charge virale diminue et la progression de la fibrose augmente par rapport à la phase précédente. Cette phase peut durer pendant plusieurs années durant lesquelles le taux de perte spontanée de l'AgHBe est augmenté **(Liaw et Chu ,2009).**

Elle se manifeste après la séroconversion HBe, qui correspond à l'apparition d'anticorps dirigés contre l'AgHBe induisant la disparition de cet antigène. Elle est caractérisée par une charge virale faible, voire indétectable du fait du contrôle immunitaire de l'infection. **(Liaw et Chu ,2009).**

I-7-3)-Évolution de l'hépatite chronique :

Carcinome hépatocellulaire :

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), avec une incidence estimée à plus de 500 000 cas en l'an 2000, est le cinquième cancer le plus fréquent au monde (PARKIN et al, 2001) De plus, il constitue la troisième cause de mort par cancer derrière les cancers du poumon et de l'estomac, notamment à cause de sa forte résistance aux traitements. La distribution géographique variable des CHC a permis d'identifier l'infection chronique par le VHB comme la cause majeure de ce cancer **(Ahn et al, 2005).**

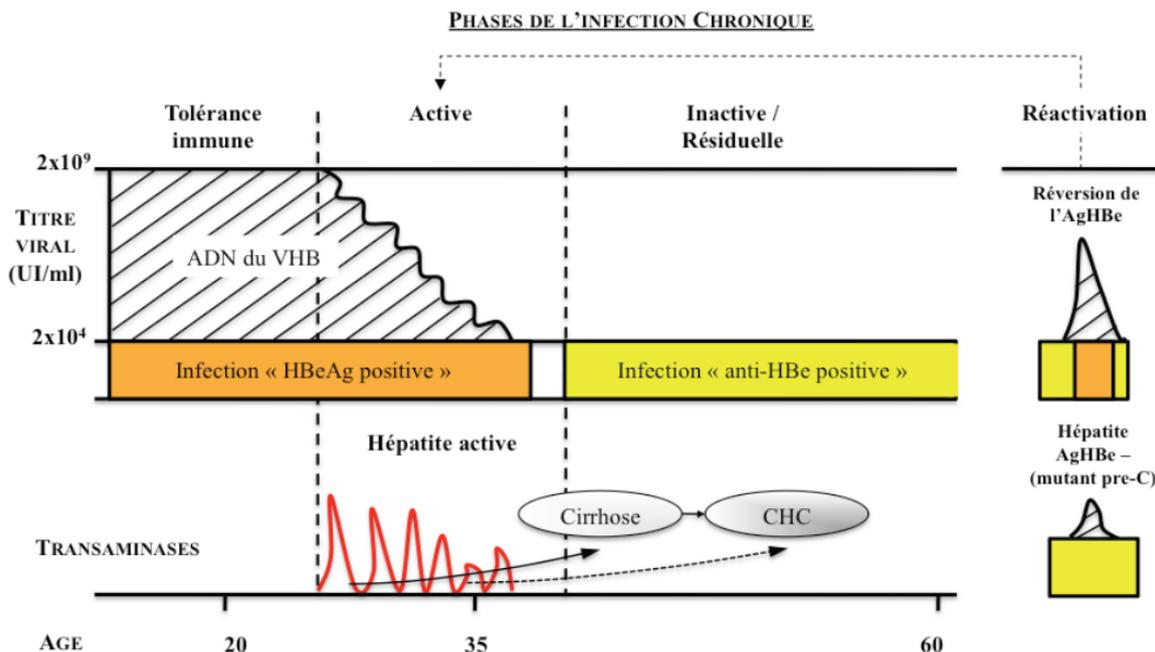


Figure05: Schématisation des événements associés aux différentes phases d'une infection chronique par le VHB. (Liaw et Chu, 2009).

I-8)- Transmission du VHB :

Le principal vecteur du virus est le sang il peut être transmis par voie buccale dans les laboratoires où l'on a longtemps aspiré à la pipette les échantillons de sang, par des liquides biologiques : salive, urines, selles et par des rapports sexuels (Quaranta et al, 1996).

I-9)- Pathogénèse :

La pathologie hépatique liée au VHB est largement causée par des mécanismes à médiation immunitaire avec une action des lymphocytes T cytotoxiques sur la clearance virale qui pourrait être le résultat de la lyse des cellules infectées par apoptose et/ou de l'action de certaines cytokines, telles que l'interféron- γ ou le TNF- α , capables d'inhiber la réplication intracellulaire du virus.

Les mécanismes pathogéniques précis responsables d'une pathologie hépatique nécro-inflammatoire aiguë et chronique associée au VHB et les déterminants de la sévérité de la maladie liés au virus ou à l'hôte ont seulement été établis. La réponse immunitaire de l'hôte aux antigènes liés au VHB est importante pour déterminer le devenir d'une infection par VHB aiguë.

La force de la réponse immunitaire de l'hôte est cruciale pour éliminer le virus, mais cela cause simultanément une insuffisance hépatique (par exemple, une forme « d'hépatite » se manifestant par un accroissement des transaminases survient avant que la clearance du virus ne soit achevée). Les patients qui deviennent infectés de

manière chronique sont incapables de fournir une réponse immunitaire au VHB et subissent donc des épisodes intermittents de destruction hépatocytaire.

En résumé, l'évolution d'une infection par VHB dépend largement de l'interaction hôte virus, avec médiation de la réponse immunitaire adaptée. La réponse des cellules T spécifiques du virus est un des éléments clés de la pathogénèse de l'infection du VHB. Des variants viraux peuvent influencer sur le cours et le développement de la maladie. **(Lok ,et Mahon , 2007)**

I-10) - Diagnostic :

La gravité de l'infection par le VHB est essentiellement liée à l'évolution possible de l'hépatite chronique vers la cirrhose et l'hépatocarcinome. Le diagnostic repose largement sur la sérologie. (Bonino et al, 1984)

I-10-1)-Diagnostic Clinique :

L'examen clinique, chez un porteur chronique de l'hépatite B, est normal, si ce n'est l'existence d'une asthénie modérée dans certains cas. Dans le cas d'une hépatite chronique active, certains symptômes peuvent apparaître. Ce sont une petite fièvre, une augmentation du volume du foie et/ou de la rate ([hépatomégalie](#) et/ou [splénomégalie](#)), des poussées ictériques (symptômes d'allure pseudo-grippale : [céphalées](#), douleurs articulaires et musculaires, mais aussi des [nausées](#), [diarrhée](#), [urines](#) foncées) et des manifestations extra-hépatiques, dues aux dépôts de complexes immuns. (Bonino et al, 1987)

I-10-2)- Diagnostic virale :

Les marqueurs utilisés pour le diagnostic et le suivi d'une hépatite B comme le montre le tableau n°2 sont :

La détection d'ADN viral dans le sérum est un signe de la présence du virus dans le sang et donc sa réplication au niveau hépatique: c'est donc un marqueur de réplication virale présent au cours de l'hépatite aiguë et de l'hépatite chronique. **(Segondy,2005)**

Les antigènes HBs et HBe peuvent être détectés dans le sérum par la technique immuno-enzymatique(ELISA).

L'antigène HBs (HBsAg) apparaît précocement (avant la phase ictérique). Il témoigne la présence du virus dans le sang. Il disparaît après l'arrêt de la réplication virale dans le foie. Sa persistance au delà de 6 mois signe l'évolution vers la chronicité.

HBeAg est excrété par les cellules infectées. C'est un marqueur de réplication. Sa disparition traduit un arrêt de la réplication virale. Il existe cependant des virus mutants (mutation de la région pré-C) qui ne produisent pas HBeAg au cours de leur réplication. La mise en évidence d'une réplication virale (ADN HBV +) chez un sujet négatif pour HbeAG doit faire suspecter_ la présence d'un virus mutant.

-Les anticorps anti-HBc (HBcAc) apparaissent rapidement après l'infection.

- Les IgM anti-HBc traduisent une infection récente par HBV.

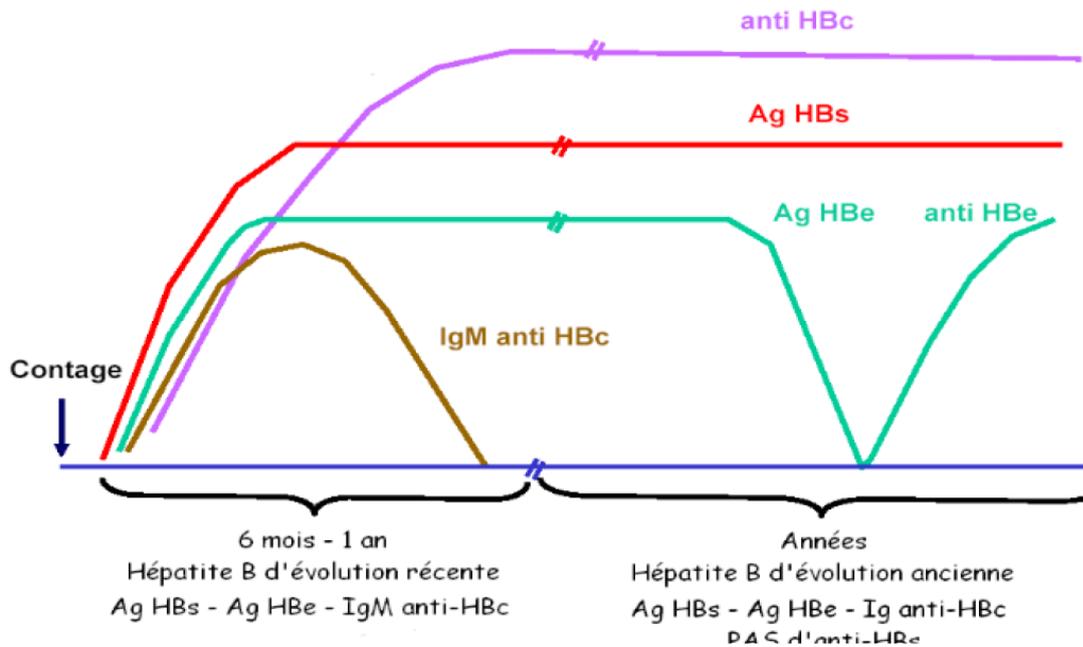
- Les IgG anti-HBc persistent toute la vie et témoignent d'une infection ancienne.

-Les anticorps anti-HBs (HBsAc) et anti-HBe (HBeAc) apparaissent dans le sang après la disparition de l'antigène (en raison de la formation de complexes immuns, on ne détecte jamais simultanément l'antigène et l'anticorps correspondant).

Par ailleurs l'apparition de HBeAc traduit le ralentissement de la réplication virale (sauf pour les virus mutants au niveau de la région pré-C). -l'apparition de HBsAc traduit la guérison de l'hépatite aiguë ou chronique. (*Segondy,2005*)

Le diagnostic d'hépatite virale B est confirmé par la recherche de certains antigènes, anticorps et par l'ADN du VHB. l'Ag HBs est l'antigène de surface du virus, il indique la présence du virus et donc la contagiosité. l'Ag HBe du virus montre une corrélation entre la réplication virale et le degré d' infection. l'AC Anti HBs remplace l'Ag HBs lorsque l'hépatite B aiguë évolue vers la guérison. Il traduit également la réponse immunologique a la vaccination. l'AC Anti HBc montre par sa présence un contact avec le VHB sans présager de l'évolution vers la chronicité ou la guérison.

Les IgM témoignent une hépatite aiguë et les IgG persistent a vie après le contact. **Fried et al, 2002,WHO).**



Fried et al, 2002,WHO

En effet une personne négative pour l'AgHBs, mais positive pour les anticorps anti-HBs signifie une guérison d'une infection antérieure, ou vaccinée auparavant.

Les personnes qui restent AgHBs positifs pendant au moins six mois sont considérés comme porteurs du virus de l'hépatite B. Les porteurs du virus peuvent développer une hépatite B chronique, qui se traduira par un taux sérique élevé de [transaminases](#) et une inflammation du foie, révélée par la biopsie. Les porteurs qui sont AgHBe négatifs, en particulier ceux qui ont contracté l'infection à l'âge adulte, ont très peu de réplication virale et, par conséquent, peuvent présenter peu de risque de complications à long terme ou de transmission de l'infection à d'autres personnes tableau 2.

(Chu et Liaw, 2007)

Tableau 01: Le diagnostic virologique. (Zuckerman et Baron ,1996)

	Ag HBs	IgM anti-HBc	IgG anti-HBc	ADN VHB	Ag HBe	IgG anti-HBe	IgG anti-HBs
Hépatite aigüe	+	+	+	+/-	+/-	-	-
Fin d'hépatite aigüe	-	+	+	-	-	+	-
Hépatite chronique active	+	-	+	+	+	-	-
Porteur sain	+	-	+	-	-	+	-
Vaccination	-	-	-	-	-	-	+

L'immunisation par la vaccination contre le VHB reste le moyen le plus efficace pour prévenir L'hépatite B et ses conséquences. (WHO, 2002).

Le mécanisme de la vaccination repose sur l'induction D'anticorps neutralisants, ayant pour but de bloquer la pénétration des Ag viraux dans L'organisme a la période initiale du cycle du VHB. (WHO, 2004)

Actuellement ce sont les vaccins recombinés, issus du génie génétique qui sont disponibles. Ils sont fabriqués en utilisant de l'Ag HBs synthétisé par des levures ou des cellules de mammifères dans lesquelles un gène codant pour l'Ag HBs a été introduit (puro et al ,2005).

En effet la vaccination n'est le seul moyen de lutter contre l'infection par le VHB le respect des bonnes pratiques d'hygiène, de la stérilisation des dispositifs médicaux utilisés lors d'actes médicaux invasifs

I-12)- Traitement :

Malgré l'existence d'un vaccin efficace, de nombreuses personnes dans le monde n'ayant pu être vaccinées ont été infectées chroniquement par le VHB. Différents traitements, consistant schématiquement en l'utilisation d'interférons ou d'inhibiteurs de la polymérase virale, peuvent être utilisés pour traiter ces personnes lorsqu'elles développent une hépatite

La première étape nécessaire à la mise en place d'un traitement adapté et efficace consiste à vérifier la relation de cause à effet entre les symptômes observés d'une part et la présence d'une infection par le VHB d'autre part.

La deuxième étape consiste à évaluer l'activité de la maladie qui se traduit par une cytolyse (élévation des taux sériques des transaminases ALAT et ASAT), reflet de l'intensité de la nécrose hépatocytaire. **(Lok et Mahon, 2007, Easl, 2009)**

Les interférons sont des molécules immunomodulatrices dont l'efficacité, après 4 à 12 mois de traitement, est de 30-40% chez des patients chroniquement infectés par un virus sauvage AgHBe positif. Ce type de thérapie est indiqué chez les patients, généralement jeunes, présentant une infection du foie compensée, un génotype favorable (A ou B), une virémie faible et un taux de transaminases élevé. Le suivi des patients traités a permis de démontrer que les thérapies à base d'interféron étaient bénéfiques à long terme en permettant d'augmenter les taux de séroconversion HBe et HBs, et de diminuer la fréquence de survenue de la cirrhose et du carcinome hépatocellulaire. Ainsi, l'avantage important de ce type de thérapie consiste en la durée définie du traitement et l'absence de résistance **(Lok et Mahon, 2007, Easl, 2009)**

Ces antiviraux, à savoir la lamivudine, l'adefovir, l'entecavir, la telbivudine et le tenofovir, cités par ordre de leur apparition sur le marché pour traiter le VHB, correspondent à des analogues de nucléotides ou de nucléosides ayant une grande affinité pour la polymérase virale. Leur action inhibitrice passe par leur incorporation dans la molécule d'ADN viral afin de bloquer son élongation. Ils ont l'avantage d'être rapidement efficaces pour inhiber la réplication virale, d'être bien tolérés et peuvent être administrés par voie orale.

(Lok et Mahon,2007,Easl,2009)

I-12-3)-Transplantation hépatique:

Elle est indiquée en cas de cirrhose sévère, d'hémorragie digestive ou d'encéphalopathie. Elle pose essentiellement le problème de la récurrence de l'infection par le VHB. Le risque d'infection du greffon est très élevé, de l'ordre de 80 %. Le mécanisme de réinfection est mal connu. Il pourrait se faire à partir de virions

persistants dans le sérum ou à partir d'autres sites d'infection comme les cellules mononuclées sanguines. **(Ghany, Doo, 2010)**

II- Technique immuno-enzymatiques on distingue deux méthodes selon **(Rubin ,1979)**

a)- Méthode Elisa : cette méthode comporte 3 types :

-Elisa sandwich

-Elisa indirecte

-Elisa compétitive

b)- Méthode microparticulaire sur AxSYM .

les deux méthodes utilisés pour la détection des antigènes HBs dans le sérum de malade .

Le tableau n°2 indique les principales caractéristiques l'Elisa sandwich et technique microparticulaire

Tableau 02: Les principales caractéristiques des Elisa sandwich et technique microparticulaire (Rubin,1979)

Caractéristique	Technique microparticulaire sur AxSYM	Elisa sandwich
Principe	Immunoenzymatique Micro partculaire	Immunoenzymatique Elisa sandwich
Technique	Automatisée	Automatisée
Appareils utilisés	l'automate l'AXSYM	Elisa
Composition de la plaqu	Microparticules recouvertes d'anticorps anti-HBs :les anticorps sont de souris ,et monoclonal , IgM .	puits enduites d'un anticorps monoclonal (mab) dirigé contre l'HBs Ag.
Echantillon	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma
Conjugué	phosphatase alcaline contenant des IgG	Anticorps de chèvre marqués à la peroxydase
substrat	phosphate de méthyl-4-ombelliféryl	Tétraméthylbenzidine (TMB)
La durée de l' analyse	20 min	110 min
La detection de composé coloré	La detection de ce composé coloré se fait grace a l'appareil optique MEIA	La composé coloré Est déterminée avec un lecteur Elisa

1-Technique microparticulaire sur AxSYM :

l'antigène de surface du virus de l'hépatite B est réalisé par technique immunoenzymatique microparticulaire (MEIA) sur automate AxSYM d'ABOTT pour la détection qualitative de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (AgHBs) dans le sérum ou le plasma humain. l'échantillon, les microparticules recouvertes d'anticorps anti-HBs et l'anticorps anti-HBs marque a la biotine se combinent dans un puits de la cartouche de réaction, lorsque l'AgHBs est présent dans l'échantillon, il se lie aux microparticules recouvertes d' anticorps anti-HBs et a l'anticorps anti-HBs marque a la biotine pour former un complexe anticorps-antigène-anticorps dans le mélange réactionnel. Une fraction du mélange réactionnel est transférée sur la matrice. Les microparticules se lient irrévérablement sur la matrice en fibres de verre. Le conjugué d'anticorps anti-biotine : phosphatase alcaline est distribue sur la matrice et se lie a tout complexe anticorps -antigène lie aux microparticules .

La matrice est lavée afin d'éliminer le matériel non lié aux microparticules. Le substrat, phosphate de méthyl-4-ombelliferyl, est ajouté. Le conjugué marqué à la phosphatase alcaline catalyse la séparation d'un groupement phosphate du substrat, conduisant à l'obtention d'un produit fluorescent, le méthyl-4-ombelliféron. Ce produit fluorescent est mesuré par le système optique MEIA. **(Rubin ,1979)** .

2-Elisa sandwich:

Elle repose sur l'utilisation d'un support solide (puits de microfiltration, billes, microparticules). Ce dernier est recouvert d'anticorps monoclonaux pour la détection des antigènes. Le sérum du patient est mis au contact du support ainsi revêtu. Un complexe antigène-anticorps se forme alors. La révélation de ce complexe est effectuée par une enzyme transformant un substrat en un composé coloré ou émettant un signal. La détection de ce composé coloré se fait grâce à un spectrophotomètre, un fluorimètre, ou un chimioluminomètre, selon le type de signal émis. **(Rubin ,1979)**

A red banner with wavy, irregular edges, resembling a piece of paper or a ribbon, centered on a white background. The banner has a slight 3D effect with a thin white border.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II -MATERIEL et METHODES :

Notre étude a été réalisée sur 60 patients dont (30homme et 30 femme et). Au niveau de laboratoire d'immunologie de l'hôpital de blida , du mois d' Aout au mois d' octobre2014

II-1-prélèvement :

Le sang d'abord prélevé par ponction veineuse dans un tube sec avec Anti - coagulant. Après, désinfection avec l'alcool on a prélevé de 10ml de sang veineu dans un tube hépariné.

II-2-Préparation du sérum ou plasma :

On a effectué les prélèvements dans des tubes secs, puis on a centrifuge à 3000 tours/mn pendant 5min pour l'obtention d'un sérum.

II-3-Diagnostic sérologique :

Techniques d'analyses :On a utilisé deux techniques différentes :

1- Technique immunoenzymatique sur l'automate (AxSYM)(deuxième génération)

2-Technique immunoenzymatique Elisa sandwich.(troisième génération)

II-3-1-Méthode immunoenzymatique microparticulaire sur AxSYM (deuxième génération) :

Ce dosage immuno-enzymatique microparticulaire surAxSYM AgHBs est utilisée pour la détection qualitative de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (AgHBs) dans le sérum humain .

a)- Matériels :

1-Appareillage :

-Automate de sérologie AxSYM .(voir Annexe2) .

2-Petits Matériels :

-Les réactifs utilisés dans le dosage AxSYM Hbs :

-**contrôles AxSYM AgHBs** : représentés par deux flacons dont chacun contient un volume de 8 ml . ces contrôles sont préparés avec du plasma humain et il existe deux formes :

-**Contrôle négatif** : qui est non réactif pour l'AgHBs et pour et pour les anticorps anti-HBs .

-**Contrôle positif** est réactif pour l'AgHBs et non réactif pour l'anti-HBs

-**Solution de lavage de l'aiguille** : contenant du tétraéthylammonium hydroxyde à (TEAH)

-**Solution de lavage de la matrice** (Matrice cell wash) : contenant 0.3 mol/l de chlorure de sodium ,un conservateur et un anti microbien .

-**Solution de diluant** (line diluent) : contenant 0.1 mol/l de tampon phosphate .

Flacon de de microparticules recouvertes d'anticorps anti-Hbs :les anticorps sont de souris et monoclonal , IgM .

- **Flacon de conjugué d'anticorps anti-biotine dans du tampon TRIS** : phosphatase alcaline contenant des IgG .

- **Flacon d'anticorps anti-Hbs (chèvre ,IgG)** marqués à la biotine :contenant des sérums d'origine animale dont la concentration minimale est 0.25ug/ml

- **Flacon de solution** contenant du phosphate de méthyl-4-ombelliféryl .

b)-Principe :

La méthode microparticulaire sur AxSYM AgHBs est un dosage immunoenzymatique qui utilise des microparticules recouvertes d'anticorps anti-HBs monoclonaux pour détecter l'AgHBs le pipetage est effectué par l'aiguille d'échantillonnage dans les différents puits de la cartouche de réaction (CR) des échantillons et tous les réactifs AxSYM AgHBs

Les réactions ont lieu dans l'ordre suivant , l'échantillon-les microparticules recouvertes d'anticorps anti-HBs et l'anticorps anti HBs marqué à la biotine se combinent dans un puits de la cartouche .Le conjugué marqué à la phosphatase alcaline catalyse un groupement phosphate du substrat conduisant à l'obtention d'un produit fluorescent qui est mesuré par le système optique . **(Rubin, 1979)**

C-)Mode opératoire :

Après avoir centrifugé tous les tubes ,et avoir placés dans la cartouche réactionnelle (CR) , l'échantillon et tous les réactifs nécessaires pour une série de dosage sont pipetés par l'aiguille d'échantillonnage dans les différents puits de CR se trouvant

dans l'unité d'échantillonnage la CR est immédiatement transférée dans l'unité de traitement où le pipetage continue avec l'aiguille de traitement, dont les réactions ont lieu dans l'ordre suivant :

- L'échantillon, les microparticules recouvertes d'AC anti-HBs et l'anticorps anti-HBs marqué à la biotine se combinent dans un puits de la CR.

- Lorsque l'AgHBs est présent dans l'échantillon, il se lie aux microparticules recouvertes d'anticorps anti-HBs et à l'anticorps anti-HBs marqué à la biotine pour former un complexe anticorps-antigène-anticorps dans le mélange réactionnel.

- Une fraction du mélange réactionnel est transformée sur la matrice où les microparticules se lient irréversiblement en fibre en verre.

- Le conjugué d'anticorps anti-biotine : phosphatase alcaline est distribué sur la matrice et se lie au complexe AC-Ag-AC lié aux microparticules.

- La matrice est lavée afin d'éliminer le matériel non lié aux microparticules.

- Le substrat, phosphate de **méthyl-4-ombelliféryl**, est ajouté. Le conjugué marqué à la phosphatase alcaline catalyse la séparation d'un groupement phosphate de substrat, conduisant à l'obtention d'un produit fluorescent le **méthyl-4-ombelliféron**.

.

- Ce produit fluorescent est mesuré par le système optique.

La présence ou l'absence de l'AgHBs dans l'échantillon est déterminée en comparant le taux de formation du produit fluorescent à la valeur seuil calculée à partir d'une calibration indice AxSYM AgHBs.

d)-Lecteur :

L'AxSYM calcule la valeur seuil à partir de la valeur moyenne du calibrateur et mémorise le résultat.

La valeur seuil = valeur moyenne de calibrateur *2

Les résultats de dosage AxSYM AgHBs peuvent être exprimés sous forme de rapport S/CO.

$S/CO = VE/VS$

Les échantillons dont la valeur S/CO est supérieure ou égale à 1.00 sont considérés comme réactifs pour l'AgHBs.

Les échantillons dont la valeur S/CO est inférieure à 1.00 sont considérés comme négatifs par le dosage AxSYM Ag HBs. (**Rubin, 1979**)

S : le ration de la valeur de l'échantillon

CO : l'unité de la valeur seuil

VE : la valeur de l'échantillon

VS : la valeur seuil.

II-3-2-Méthode immunoenzymatique Elisa sandwich.(troisième génération)

. Cette méthode est principalement utilisée en [immunologie](#) pour détecter la présence d'antigène HBs dans le sérum et plasma humains, c'est le premier marqueur sérologique

a)-Matériels :

1-Appareillages

Centrifugeuse

Accessoire Elisa (voir annexe03)

-Incubateur

-Laveur

- Lecteur .

2-petits matériels :

-Les réactifs :

-Contrôles négatifs : c'est un flacon de 2,5 ml de sérum humain normale , ce dernier est dilué dans un tampon contenant des protéines d'origine bovin ,contient 0.05%de conservateur Bronidox

-Contrôle positifs Ag HBs :

C'est un flacon de 2 ml contenant du sérum humain inactivé , ce dernier est dilué dans un tampon contenant des protéines d'origine bovine , le sérum contient 0.05% de conservateur Bronidox

-Conjugué :

C'est un flacon qui contient des anticorps de chèvre dirigés contre l' AgHBs et marqué à la peroxydase , le conjugué est de couleur rouge.

Diluant substrat :

C'est un flacon qui contient 35 ml d'une solution incolore de citrate tri sodique et d'eau oxygénée.

Substrat concentré :

C'est un flacon contenant 35 ml d'une solution de tetraméthylbenzidine (TMB) et des stabilisateurs.

principe :

La technique Éliisa sandwich directe de troisième génération a pour but la détection d'antigènes en utilisant des puits enduites d'un anticorps monoclonal (mab) dirigé contre l'HBs Ag. le principe de cette méthode est basé sur la réaction simultanée entre

L'échantillon et les mab immobilisés et avec un anticorps poly-clonal anti- HBs (cobaye) conjugué avec de la peroxydase de raifort .en effet si l'HBsAg est présent dans l'échantillon, le complexe contenant la peroxydase est retenu à la surface du puits.

.La solution de substrat est ajoutée et, une couleur bleue se développe .Après l'arrêt de la réaction la solution vire vers le jaune. L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la quantité d' HBs dans l'échantillon. L'absorbance des contrôles des échantillons est déterminée avec un lecteur Éliisa. Les résultats sont déterminés par comparaison avec la valeur seuil.**(Magnius et al,1975).**

b)-Mode opératoire :

Les solutions lavage (W) et substrat(S) sont préparé (voir annexe1)

On verse 50 UI de contrôle négatif dans les puits B1, C1, D1 et 50ul de contrôle positif dans les puits E1, F1. et 50 ul de sérums dans les autres puits ensuite on ajoute 50ul de l'échantillon(E) et solution conjugué à chaque puits.

On recouvre la plaque par des feuilles adhésives et on incube pendant 80 min à 37°C puis on lave la plaque 8 fois avec solution de lavage par le lecteur Éliisa .

Après avoir ajouté 100ul de substrat dans tous les puits .une coloration bleue apparaît dans les contrôles positifs .On recouvre la plaque par des feuilles adhésives et on incube pendant 30 min à température ambiante (15 à 25°C). ensuite on ajoute 100ul de solution d'arrêt (acide sulfurique) dans chaque puits. une coloration jaune apparaît dans les contrôles positifs.

On fait la lecture de la densité optique en utilisant le lecteur Éliisa .on lire l'absorbance à 450 nm et en utilisant une longueur d'onde de référence de 620-690 nm.

d)-Lecteur :

Les résultats sont déterminés par le calcul de la valeur seuil (VS) à partir de la moyenne des contrôles négatifs et à laquelle on ajoute le coefficient $K = 0.025$ selon la formule suivante :

$$\text{MNC} = \frac{\text{DO450(B1)} + \text{DO450(C1)} + \text{DO450(D1)}}{3}$$

$$\text{VS} = \text{MNC} + K \rightleftharpoons \text{VS} = \text{MNC} + 0.025$$

En effet les échantillons dont la DO est inférieure à VS sont considérés comme négatif. alors que Les échantillons présentant une DO supérieure ou égale à VS sont considérés comme positifs

DO: densité optique

MNC : la moyenne des contrôles négatifs.

VS : la valeur seuil

► **La confirmation des résultats positifs :**

En cas de sérologie d'Ag HBs douteuse ou positive, un deuxième test est réalisé sur le même prélèvement afin de confirmer ou d'infirmier le résultat

Résultat positif /Douteux



2ème recherche sur le même prélèvement

(Kim et al,1973)

II-4-Traitement des données et validation :

Le but du traitement des données a été de produire des fichiers d'analyse de ces données et de créer les tableaux standards. Le traitement à impliqué par :

exportation des données vers le logiciel Excel pour la réalisation de la tabulation et le graphisme . les résultats de cette étude statistique (moyenne, ecartype, variance,écartmoyenne ,median) a été enregistrés .(voire Annexe 04) .

Chapitre III

Résultats et discussion

III-Résultats et discussion :

L'étude de la recherche a été réalisée sur 60 individus répartis comme suit :

30 hommes

30 femmes

III-1-Résultats:

III-1-1-Elisa microparticulaire sur AxSYM(deuxième génération)

III-1-1-1- Sérologie de la population étudiée :

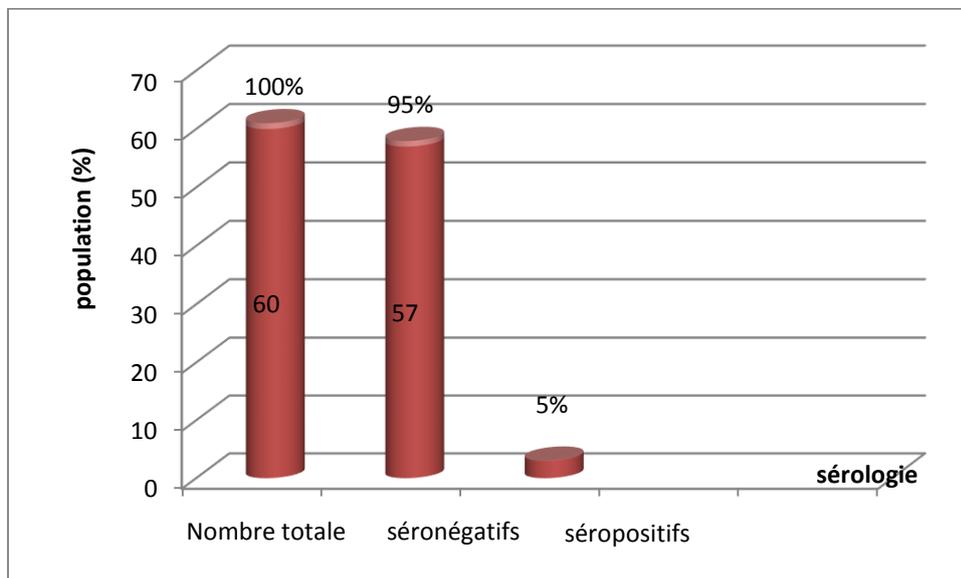


Figure07 : Sérologie de VHB par la méthode microparticulaire sur AxSYM.

Les résultats de la figure 07 montrent que le pourcentage de séropositifs est significativement très bas par rapport au séronégatifs.avec des moyennes de (2 ± 1) et $(29 \pm 16,59)$ respectivement

III-1-1-2-Répartition de VHB selon l'âge :

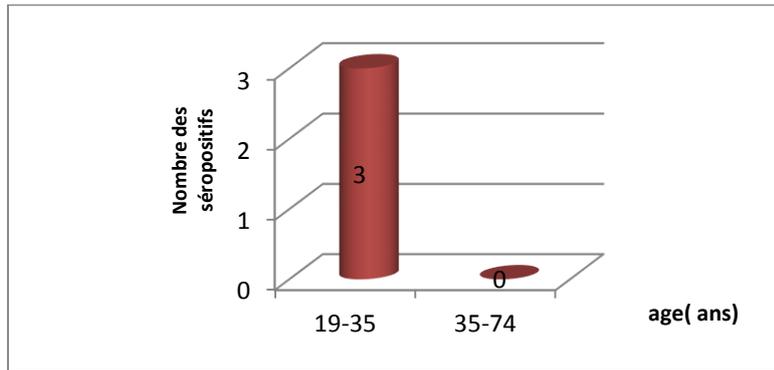


Figure 08: Répartition de séropositifs selon l'âge .

L'analyse de la figure n° 08 indique que la tranche d'âge des sujets atteints par le VHB est de 19 à 35 ans en effet , le nombre d'individus de cette tranche d'âge est t élevés par rapport au nombre d'individus entre 35 et 74 ans avec les moyennes de (2+ 1)et (0+0) respectivement .

III-1-1-3-Répartition de séropositifs selon le sexe :

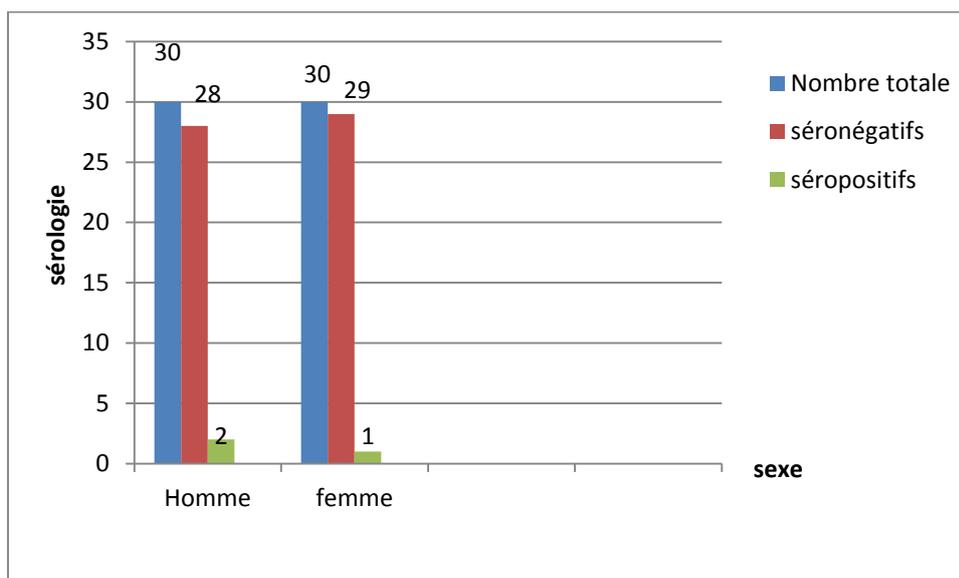


Figure 09: Répartition de séropositifs selon le sexe.

D'après les résultats illustrés dans la figure n°9 on Remarque que le nombre des hommes séropositifs est significativement élevés par rapport à celui enregistré chez les femmes (1 ±1) et (0,5 ±0,70) respectivement .

III-1-2 : Elisa sandwich (troisième génération):

III-1-2-1-Sérologie de la population étudiée :

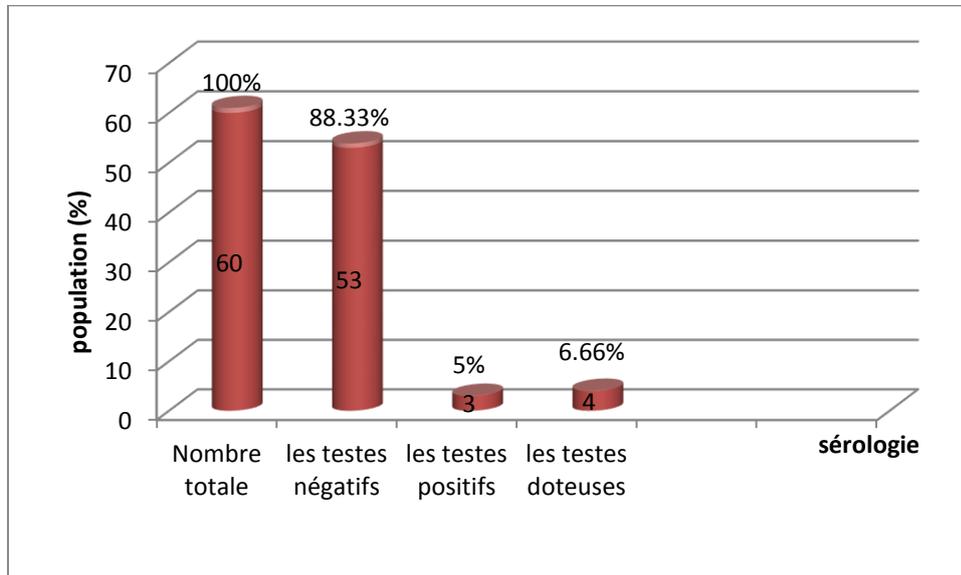


Figure10: Sérologie de VHB par la méthode sandwich

Les résultats de la figure n°10 montre que le pourcentage de séropositifs est significativement bas par rapport à celui des pourcentage séronégatifs 38,33% avec les moyennes suivants : (2 ± 1) et $(27 \pm 15,44)$ respectivement cependant 6.66% présentent un résultats douteux (faux positives) $(2,5 \pm 1,29)$ respectivement .

III-1-2-2-Repartition de séropositifs selon l'age :

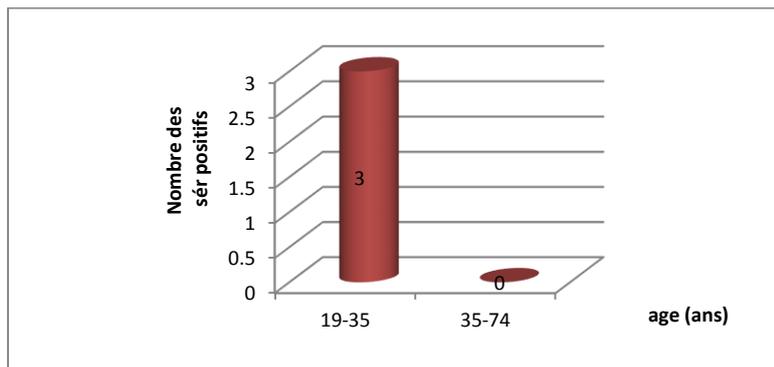


Figure 11: Repartition de séropositifs selon l'age .

Selon la figure n°11on trouve 3 cas positives dans la tranche d'age (19et35ans) ainssi le nombre. d'individus entre 19 et 35 ans est significativement élevés par rapport à celui enregistré chez la tranche d'age 35-74 ans avec des moyennes : (2 ± 1) et (0 ± 0) respectivement .

III-1-2- 3-Répartition de séropositifs selon le sexe

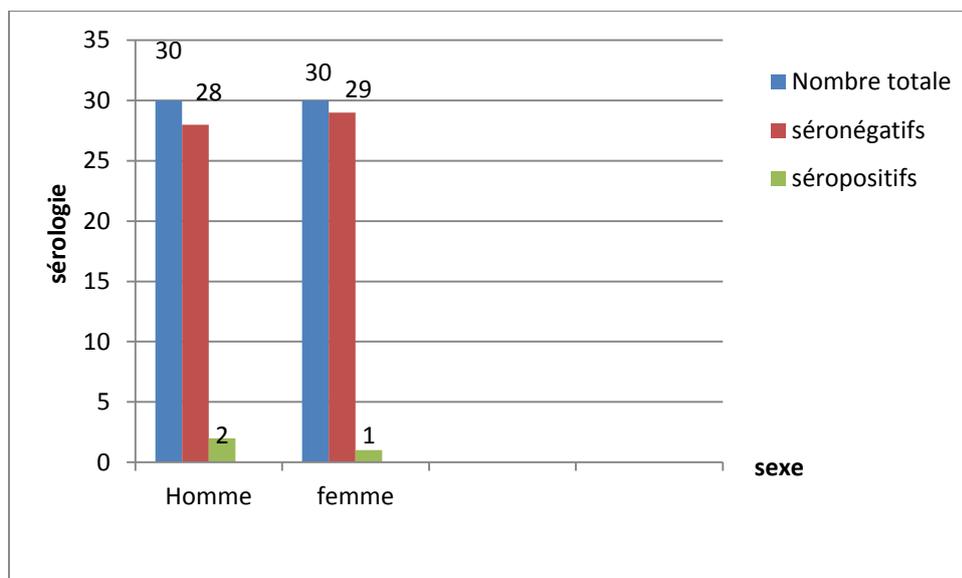


Figure 12: Répartition de séropositifs selon le sexe

D'après les résultats de la figure^o 12 on remarque que le nombre d'hommes séropositifs est significativement élevé par rapport à celui enregistré chez les femmes avec des moyennes de (1 ± 1) et $(0,5 \pm 0,70)$ respectivement

III -2-Discussion des résultats:

III -2- 1) Sérologie de la population étudiée :

Les résultats obtenus ont montré une différence significative entre les deux méthodes utilisées pour la détection de l'antigène Hbs dont :

En effet, les figures 07 et 10 montrent une différence significative dans les résultats des tests négatifs obtenus par la méthode microparticulaire sur l'automate et des résultats par Elisa sandwich. $(29 \pm 16,59)$, $(27 \pm 15,44)$ respectivement.

Cette différence dans les résultats est liée à la présence des tests douteux par la méthode sandwich qui représente 6.66%.

Zachry et al,2004: ont réalisé une étude comparative entre ces deux méthodes, ils ont conclu que la spécificité de la méthode microparticulaire est de 99,16% C'est à dire que le risque d'erreurs est de 0,84 d'avoir un test faux positif.

par rapport aux tests positifs, ils n'ont trouvé aucune différence significative (2 ± 1) , (2 ± 1) respectivement.

Par ailleurs, Payan, 2003 : la méthode microparticulaire sur l'automate permet de détecter en 20 min les antigènes HBs.

pour la méthode sandwich le temps nécessaire pour le dosage d'un seul paramètre couvre la demi-journée , contrairement à l'AxSYM qui prend peu de temps pour la detection des antigènes HBs

III -2-2)-Repartition de HBs positif selon l'âge :

Nps résultats illustrés dans les figures 08 et 11 montrent que l'AgHBs touche beaucoup plus les sujets jeunes dont la tranche d'âge 19-35 ceci est due probablement au rapport sexuels non protégés , la transmission percutanée (tatouage , piercing) , les formes asymptomatique fréquente, thérapeutique et transfusionnelles .

Selon **Bensalem et al,(2011)** : Une étude rétrospective a été réalisée au janvier 2008 jusqu'à décembre 2010 au niveau du laboratoire des hépatites virales sur un échantillon de 438 sérums de personnes hémodialysées chroniques adressées pour sérologie de l'hépatite B. l'âge moyen des patients était de 45 ans .

D'après Busch et al,(2005) les pourcentages des sujets en HBs positifs Ce sont majoritairement des jeunes de (20 à 29 ans) sexuellement plus actifs et potentiellement plus exposés aux infections.

III -2-3)-Repartition de séropositifs selon le sexe :

Les résultats représentés dans les figures n°09 et 12 nous constatons que le nombre de sujets séropositifs en HBs est plus fréquent chez les hommes par rapport aux femmes , pourrait être lié aux comportements sexuels chez les hommes .

Selon Tsega et al ,(1987) , Les prévalences de l'AgHBs étaient élevées chez les donneurs de sang, de sexe masculin .
Ont été trouvés significativement de même les travaux de **Zou et al ,(2004)** ont noté des infections incidentes essentiellement chez les hommes avec un pourcentage (88,5%),

Conclusion :

Notre objectif est de faire une comparaison de deux méthodes d'analyses médicales : la méthode immunoenzymatique microparticulaire sur AxSYM (deuxième génération) et la méthode sandwich (troisième génération) pour la détection de l'antigène HBs .

En effet Pour la méthode microparticulaire , tous les tests effectués sont fiables et aucun test douteux n' observé sur 60 échantillon (30 homme et 30 femmes).

la méthode sandwich , nous a révélé un nombre significativement important de tests douteux ce qui fausse leur interprétation .

Donc on concluons que la méthode microparticulaire sur AxSYM de deuxième génération est la plus fiable que la méthode sandwich.(troisième génération)

Par ailleurs on a dénombré la majorité des cas positifs en HBs, chez les sujets dont la tranche d'âge est comprise entre 19 et 35 ans l'antigène HBs est en outre, le premier antigène qui peut être décelé dans le sérum au de l'hépatite B

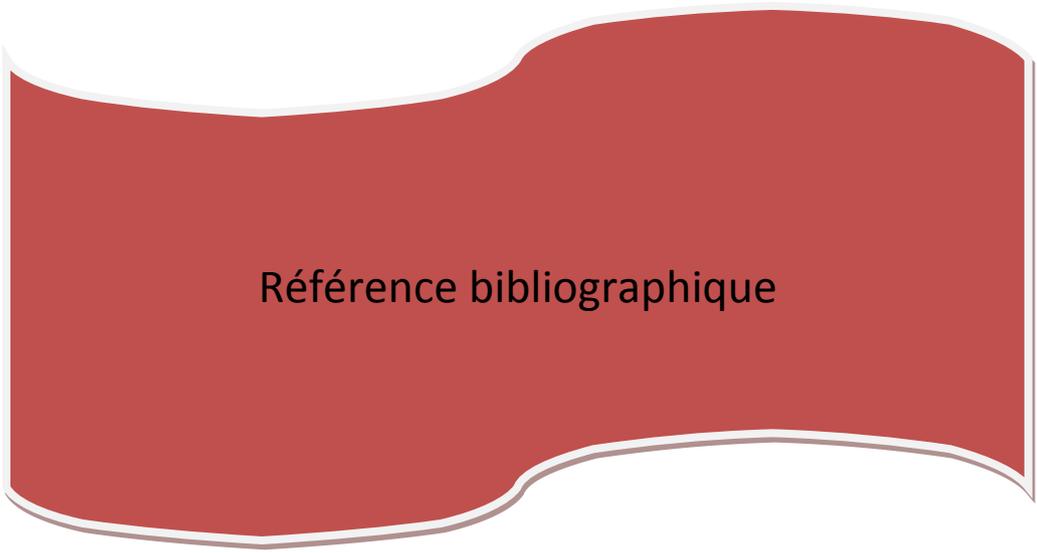
De plus nos résultats ont montré que l'hépatite B est une maladie qui touche beaucoup plus le sexe masculin par rapport aux féminin .

D'autre part la fréquence de cette maladie n'est pas élevée dans l'hôpital (Ibrahim ibn techirin) Blida car la plupart des résultats obtenus sont des cas négatifs.

Le meilleur moyen pour le diagnostic de l'hépatite B est la recherche de l'AgHBs par les tests sérologiques.

En outre le dépistage des porteurs du virus B par la recherche systématique de l'Ag HBs seul, reste insuffisant. Il est nécessaire d'y adjoindre la recherche Systématique des AC anti-HBc. telle que réalisé a l'institut pasteur d'Algérie.

La prévention reste le meilleur traitement



Référence bibliographique

Référence :

- 1-Ahn, Park, Park, Chang, Lee , Shin, Han, Park, Moon, Chon** (2005) Long-term clinical and histological outcomes in patients with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *J Hepatol* **42**(2): 188-194
- 2-Anaes et Inserm** (2003).. Reunion de consensus. Vaccination contre le virus de d'hépatite B. ANAES, INSERM - Paris - France 2003.
ANONYME : ACTION TRAITEMENT , Association française , présentée sur [WWW.ACTION – TRAITEMENTS.org](http://WWW.ACTION-TRAITEMENTS.org)
- 3-Bensalem, Seghier et al** (2010)Enquete serologique de l' hépatite virale B et C chez les hemodialyses chroniques. Etude de l'Institut Pasteur d'Algerie en 2010. 1er congrès de la societe tunisienne d' hygiène et de la securite de soins Monastir -Tunisie 2011.
- 4-Bonino , Hoyer , Shih , Rizzetto , Purcell , Gerin** (1984) Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta- associated particle. *Infect Immun* **43**(3): 1000-1005
- 5-Bruss et Ganem** (1991b) The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(3): 1059-1063
- 6-Bruss, Gerhardt, Vieluf, Wunderlich** (1996a) Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* **39**(1-2): 23-31
- 7-Busch, Ginn, Stramer, Strong, Caglioti, Wright, Papalardo, Kleinman** (2005)NHLBI-REDS NAT Study Group. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion* 2005; 45:254-264.
- 8-Catrice** (2009) Prevention de l'hépatite B dans les populations migrantes originaires de zones de forte endemie Afrique subsaharienne et d' Asie. e. Université Paris 7- Faculté de Médecine.
- 9-Chu et Liaw** (2007)« Predictive factors for reactivation of hepatitis B following hepatitis B e antigen seroconversion in chronic hepatitis B », *Gastroenterology*, vol. 133, n° 5, 2007, p. 1458–65 ([PMID 17935720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17935720/), [DOI 10.1053/j.gastro.2007.08.039](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.039))
- 10-Payn(2003)** :Annale de biologie Clinique, volum 58 ,numéro 6,715-20
- 11-Debzi.** (2005) .Les hépatites virales aiguës Cours polycopie - « Cours atelier d'épidémiologie d'intervention sur les pathologies sahélo sahariennes » - Institut Pasteur d' Algérie - Alger, 2005
- 12-Diot, Gripon, Rissel, Guguen-Guillouzo** (1992) Replication of hepatitis-B virus in differentiated adult rat hepatocytes transfected with cloned viral DNA. *Journal of medical virology* **36**(2): 93-100
- 13-Easl** (2009) EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* **50**(2): 227-242

- 14- Evans, O'Connell, Pugh, Mason, Shen, Chen, Lin, Dia, M'Boup, Drame, London** (1998) Geographic variation in viral load among hepatitis B carriers with differing risks of hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**(7): 559-565
- 15-Fried,Tytgat et al** (2002). Recommandations pratiques de la WGO : Vaccination contre l'hepatite B, World Gastroenterology Organisation.
- 16-Ghany et Doo** (2010) [Antiviral resistance and hepatitis B therapy \[archive\]](#), *Hepatology*,49:S174-S184)
- 17- Goldstein , Zhou , Hadler , Bell , Mast , Margolis (2005)** A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol* **34**(6): 1329-1339
- 18-Hurax , Claude , Agut et Lafeuille** (2003).Traité de virologie médicale , ; 699p.
- 19-Kim,Tilles ,Clin.invest** (1973).52 ,1176-1186.
- 20- Laureceau et Marcellin** (1998) .Comment vit –on avec une hépatite ?;;241p
- 21-Liaw et Chu,**(2009) : Hepatitis B virus infection. *Lancet* **373**(9663): 582-592.
- 22-Lok et Mahon** (2007)..Chronic hepatitis B, *Hepatology* 2007;45:507–39
(availableat:<http://www.aasld.org/practiceguidelines/Documents/Practice%20Guidelines/chronichepBcorrection.pdf>, accessed 30 August .
- 23-OMS (2008)** Prevention of viral hepatitis (B and C) Reassessed. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; **22**: 1009-1029
- 24-ParKin, Bray, Ferlay, Pisani** (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**(2): 153-156
- 25-Puro , De carli et al** (2005) . European recommendations for the management of healthcare workers occupationally exposed to hepatitis B virus and hepatitis C virus. *Euro Surveill*; **10**(10): 260-4.
- 26-Quaranta , Reboulot et Cassuto** (1996) .Hépatite virale , ;110p
- 27-Rubin.** (1979). Federation proceedings **38**,2665-2673 .
- 28-SegondYy** (2005) Documents complémentaires disponibles en ligne sur le site de la Haute Autorité de Santé (HAS, ex-ANAES) : <http://www.anaes.fr>
- 39-Stanislas** (1996) . les hépatites virales , 124 p
- 30-Tebbal., Bougermouh., Belabes et al** (1998).
Enquete nationale sero-epidemiologique de l'Ag HBs en Algerie (IPA, INSP, OMS 1998)
Communication orale- Alger .

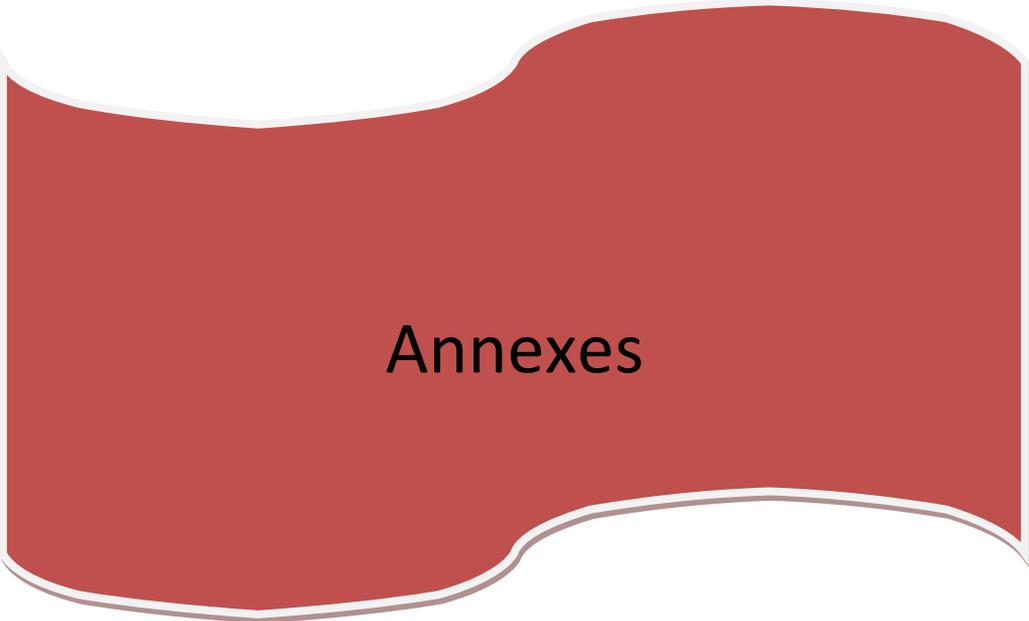
31-Tsega, Mengesha, Nordenfelt, Hanssoo, Lindberg. (1987). *Prevalence of hepatitis B virus markers among Ethiopian blood donors: is HBsAg screening necessary?* *TropGeogr Med. Oct;39(4):336-40.*

32-WHO (2002). Hepatitis B, World Health Organization Department of Communicable Diseases Surveillance and Response, 2002. To find this document : WHO > Programmes and projects > Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR) > Diseases covered by EPR > Hepatitis Geneva .

33-Zachary et al (2004) Institut de virologie faculté de médecine ,3,rue Koeberlé 67000 Stassbourg, France ,accepté le 13 juin. Travail présenté en communication affichée lors de la 23 réunion de chimiothérapie anti- infectieuse .présenté sur [WWW.john-libbey-eurotext .fr](http://WWW.john-libbey-eurotext.fr)

34-Zou, Musavi, Notari, Stramer, Dodd. (2004) Prevalence, incidence, and residual risk of major blood-borne infections among apheresis collections to the American Red Cross Blood Services, through 2008. *Transfusion* 2010 ; 50 :1487-94.

35-Zuckerman et Baron(1996). *Hepatitis Viruses. In: Baron's Medical Microbiology (Baron S et al, eds.), Univ of Texas Medical Branch, (réimpr. 4th ed.)* ([présentation en ligne \[archive\]](#))



Annexes

1-Matériels nécessaire au prélèvement :

-poche de sang.

-coton

-garrot

-tube hépariné

-Alcool

2-Préparation des réactifs pour réalisation de test Elisa Sandwich :

1-Solution de substrat (S) :

On Prépare la quantité nécessaire en mélangeant du substrat A (SA) et substrat B(SB) à parts égales dans un récipient propre en plastique rincé avec d

e l'eau dé ionisée

2- Solution de lavage (W) :

Diluer le W (solution de lavage) avec de l'eau fraiche, distillée ou dé ionisée, exemple : 50ml de W+950ml l'eau distiliée=1000.

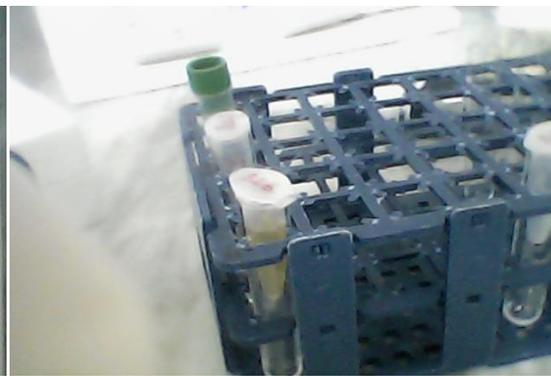
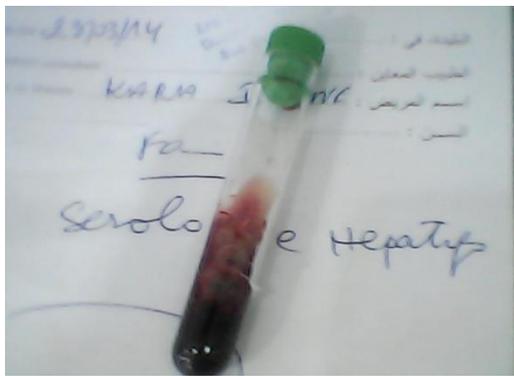


Figure 13 : tube hépariné contient le sang **Figure14** : tube hépariné contient le sérum



Figure15 : appareillage de l'automate l'AXSYM



Figure16 :L'unité d'échantillonnage



Figure 17 : Incubateur et laveur Elisa



Figure18: Lecteur Elisa

Tableau 01 : Répartition de l'antigène HBs en fonction de nombre de prélèvement de sang par la méthode microparticulaire sur l'automate .

Nombre totale	Sérologie négatif	Sérologie positif
60	57	03

Tableau 02 : Répartition de HBs en fonction de nombre de prélèvement par la méthode sandwich

Nombre totale	Sérologie négatifs	Sérologie positifs	Faux positifs
60	53	03	04

Tableau03 : représente les résultats de dépistage de l'hépatite B par la méthode classique sur AxYM :

L'étude statistique	Nombre totale	Les tests négatifs	Les tests positifs
La moyenne	30,5	29	2
ecartype	17,4642492	16,5981927	1
variance	305	275,5	1
ecartmoyen	15	14,245614	0,66666667
mediane	30,5	29	2

Tableau 04: représente la sérologie de dépistage de l'hépatite B par la méthode sandwich

L'étude statistique	Nombre totale	Les tests négatifs	Les tests positifs	Les tests douteuse
moyenne	30,5	27	2	2,5
ecartype	17,4642492	15,4434452	1	1,29099445
variance	305	238,5	1	1,66666667
ecartmoyen	15	13,245283	0,66666667	1
mediane	30,5	27	2	2,5

Tableau05 :Répartition de HBs positif selon l'age .(la méthode sandwich)

Etude statistique	19-35	25-45	45-74
-------------------	-------	-------	-------

moyenne	2	2,5	0
ecartype	1	1,29099445	0
variance	1	1,66666667	0
ecartmoyen	0,66666667	1	0
mediane	2	2,5	0

Tableau 06: Répartition des porteurs de HBs positif selon l'âge (la méthode microparticulaire MEIA sur AxYM).

Etude statistique	19-35	45-74
moyenne	2	0
ecartype	1	0
variance	1	0
ecartmoyen	0,66666667	0
mediane	2	0