RÉPUBLIQUE DU BÉNIN

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA SANTÉ

UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE EN MÉDECINE

Année : 2023 **N° 2538**

Facteurs de risque de portage chronique du virus de l'hépatite B et effets du polymorphisme du gène rs3077 à Cotonou

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

DIPLÔME D'ÉTAT

Par

LALEYE Maurel Xavier Abodunrin

Né le 02 janvier 1999 à Porto-Novo (République du Bénin)

Directeur de thèse

Pr. Jean SEHONOU

Codirecteur

MCA Simon AZONBAKIN

Jury composé de :

Président :

Pr. Victor YAO GNANGORAN

Membres

Pr. Jean SEHONOU

MCA Raïmi KPOSSOU

Liste des enseignants

REPUBLIQUE DU BENIN
*****
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE
****

N°1200 /2022/UAC/FSS/VD-Ecoles/VD-UFR Pharma/VD UFR Méd/SGE/CSRH/SA

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

NOVEMBRE 2022

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN : Professeur AVAKOUDJO Josué Dejinnin Georges

VICE-DOYEN U.F.R Médecine : Maître de Conférences Agrégé VODOUHE Ulrich Bidossèssi

VICE-DOYEN U.F.R Pharmacie : Maître de Conférences Agrégé GANFON Medessou Yowel Habib

VICE-DOYENNE /ECOLES : Professeur AZON KOUANOU Angèle

Année : 2022-2023 (version novembre 2022)

PROFESSEURS TITULAIRES

1.	Dr HOUINATO Dismand Stéphan.....	Neurologie
2.	Dr ADJIBABI Wassi.....	ORL-Chirurgie Cervico Faciale
3.	Dr MEHINTO Delphin Kuassi.....	Chirurgie Viscérale
4.	Dr GANGBO Flore	Histologie- Embryologie-Cytogénétique
5.	Dr LALEYE Anatole O. A	Histologie-Embryologie-Cytogénétique
6.	Dr AMOUSSOU-GUENOU Marcellin Kuassi.	Biophysique, Médecine Nucléaire
7.	Dr FIOGBE Michel Armand.....	Chirurgie Pédiatrique
8.	Dr HANS-MOEVI Aristote	Orthopédie -Traumatologie
9.	Dr KPADONOU Toussaint Godonou.....	Médecine Physique – Réadaptation
10.	Dr SOUNOUVOU Ignace.....	Ophtalmologie
11.	Dr BIAOU Olivier	Imagerie Médicale
12.	Dr ODOULAMI-YEHOUESSI Lisette.....	Ophtalmologie
13.	Dr ZOUMENOU Eugène.....	Anesthésie-Réanimation
14.	Dr DENAKPO Justin Lewis	Gynécologie Obstétrique
15.	Dr DOSSOU Francis Moïse	Chirurgie Générale
16.	Dr ADEGBIDI Hugues Daniel Gbadébo	Dermatologie Vénérologie
17.	Dr AFFOLABI Dissou.....	Bactériologie-Virologie
18.	Dr ALAO Modjere Ola Maroufou Jules.....	Pédiatrie et Génétique Médicale
19.	Dr ATADOKPEDE Agbomènou Félix.....	Dermatologie- Vénérologie
20.	Dr AWEDE Bonaventure Lucien Sévérin.....	Physiologie
21.	Dr FIOSSI KPADONOU Emilie.....	Pédopsychiatrie
22.	Dr TONATO BAGNAN Josiane Angéline A.	Gynécologie-Obstétrique
23.	Dr ADJIEN Kodjo Constant	Neurologie
24.	Dr OGOUYEMI HOUNTO Aurore Bertille.	Parasitologie
25.	Dr SAGBO Gratien.....	Pédiatrie
26.	Dr SEHONOU Jean	Hépato-Gastro-Entérologie
27.	Dr AGODOKPESSI Gildas	Pneumo-Phtisiologie
28.	ALAMOU Soulé.....	Ophtalmologie
29.	Dr ALLABI Aurel Constant Eustache.....	Pharmacologie Clinique
30.	Dr AVAKOUDJO Josué D. Georges	Urologie-Andrologie
31.	Dr AYELO Ahounmènou Paul	Médecine du Travail
32.	Dr GNONLONFOUN Dieu donné	Neurologie
33.	Dr HOUNKPATIN Benjamin I. Bodounrin.....	Gynécologie Obstétrique
34.	Dr TSHABU AGUEMON Christiane	Gynécologie Obstétrique

Université d'Abomey-Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

35. Dr ZOMALHETO Zavier Cossi	Rhumatologie
36. Dr YEKPE AHOUANSOU Hermione Patricia Frida	Imagerie Médicale
37. Dr AGUEMON Badirou Din	Santé Publique
38. Dr ALAGNIDE Hountondji Etienne	Médecine Physique et de Réadaptation
39. Dr AZON KOUANOU Angèle	Médecine Interne
40. Dr GBESSI Dansou Gaspard	Chirurgie Générale
41. Dr HINSON Vikkey Antoine	Médecine du Travail
42. Dr HOUNKPE Pierre Claver	Anesthésie-Réanimation
43. Dr LALYA Francis Honorat	Pédiatrie et Génétique Médicale
44. Dr VIGAN Jacques	Néphrologie

MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

1. Dr ASSOUTO A. Pamphile.	Anesthésie –Réanimation
2. Dr AVAKOUDJO François	ORL-Chirurgie Cervico Faciale
3. Dr LAWSON AFOUDA Sonia	ORL-Chirurgie Cervico Faciale
4. Dr SISSINTO SAVI DE TOVE Yolande	Parasitologie-Mycologie
5. Dr YEMOA Loconon Y. Achille.	Chimie Analytique-Bromatologie
6. Dr AGBODANDE Kouessi Anthelme	Médecine Interne
7. Dr ALIHONOU Thierry	Neurochirurgie
8. Dr BAGNAN TOSSA Léhila	Pédiatrie et Génétique Médicale
9. Dr GANFON M. Yowel Habib	Pharmacognosie
10. Dr KEREKOU Annelie Célestine.	Endocrinologie
11. Dr VODOUHE Ulrich B.	ORL-Chirurgie Cervico Faciale
12. Dr WANVOEGBE Armand	Médecine Interne
13. Dr CODJO Houétondji Léopold	Cardiologie
14. Dr ABOUBACAR Moufalilou	Gynécologie-Obstétrique
15. Dr ABOUKI Chakiratou Olaïdé Adoukê	Ophtalmologie
16. Dr ADJADOHOUN Sonia B.M. Gwladys	Radiologie, Radiodiagnostic et Imagerie médicale
17. Dr AKODJENOU Joseph	Anesthésie Réanimation
18. Dr AKPADJAN Gbèmawonmédè Fabrice	Dermatologie-Vénérologie
19. Dr ALIHONOU Florence Nathalie Yacoba	Pédiatrie et Génétique Médicale
20. Dr ANAGONOU Lary Lucrèce	Pédopsychiatrie
21. Dr ATTOLOU Sètondji Roger Gilles	Chirurgie Générale
22. Dr AZONBAKIN Azandégbé Simon	Histologie-Embryologie-Cytogénétique
23. Dr BIGOT Cédric Egnonwa Parfait	Médecine Légale

Université d'Abomey-Calavi • LE DOYEN • FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

24. Dr BOGNON Gilles Modeste Alain.....	Pédiatrie et Génétique Médicale
25. Dr CHIGBLO Sègla Pascal Eric.....	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
26. Dr DEGBOE Kaï Bérénice Esthelle	Dermatologie-Vénérologie
27. Dr GNANGNON Freddy Houehanou R.....	Cancérologie Chirurgicale
28. Dr HODONOU Dètondji Fred Jean-Martin...	Urologie-Andrologie
29. Dr IMOROU SOUAÏBOU Yacoubou.....	Chirurgie Générale
30. Dr KLIKPO Elvire	Psychiatrie Adulte
31. Dr KPOSSOU Aboudou Raïmi	Gastroentérologie et Hépathologie
32. Dr LAWANI Ismaïl.....	Chirurgie Viscérale
33. Dr MIKPONHOUE OLOU Rose Christelle	Médecine du Travail
34. Dr OGOUDJOBI Ogourindé Mathieu.....	Gynécologie-Obstétrique
35. Dr PADONOU Abiodun Adébola Djossè.....	Traumatologie-Orthopédie
36. Dr PADONOU Caroline Sourou Clémence.....	Pédiatrie et Génétique Médicale
37. Dr PADONOU Sètondji Géraud Roméo.....	Santé Publique
38. Dr SEIDOU Falilatou	Anatomie et Cytologie Pathologique
39. Dr SONOU Djidjoho Joël Arnaud.....	Cardiologie
40. Dr TOGNIFODE Medesse Véronique.....	Gynécologie-Obstétrique
41. Dr WACHINOU Ablo Prudence.....	Pneumo-Phtisiologie
42. Dr YEVI Dodji Magloire Inès.....	Urologie Andrologie
43. Dr ZOHOUN GUIDIGBI Lutécia Myria A.....	Pédiatrie et Génétique Médicale

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

MAITRES ASSISTANTS

1. Dr GANDAHO Hugues Jean-Thierry	Neurochirurgie
2. Dr AGBOTON Bruno Léopold	Néphrologie
3. Dr DJOSSOU Médésse David.....	Odontologie Pédiatrique
4. Dr ADJAGBA Mahouna Philippe Dotou	Cardiologie
5. Dr AMOSSOU Labissi François.....	Traumatologie-Orthopédie
6. Dr BADOU Agnès Oladoun	Sociologie et Anthropologie sociale
7. Dr GNINKOUN Comlan Jules.....	Endocrinologie Métabolisme et Nutrition
8. Dr LOKOSSOU Mègnissè S. Houévi Symphorose...	Gynécologie-Obstétrique
9. Dr TOKOUDAGBA Kossi Jean-Marie Dénis.....	Chimie Organique et Chimie des Substances Naturelles
10. Dr ADJOBIMEY Mênonli.....	Santé au Travail
11. Dr BANCOLE POGNON Sylvie Arlette A.....	Chirurgie Buccale
12. Dr ZOHOUN Comlan Gildas Alban	Hématologie
13. Dr AHOUNOU Ernest Stéphane.....	Anesthésie-Réanimation

FEVRIER 2022

14. Dr AÏGBE Nestor.....	Ophtalmologie
15. Dr DANGBEMEY Djima Patrice.....	Gynécologie-Odstrétique
16. Dr DO SANTOS ZOUNON Alexis.....	OTO-Rhino Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale
17. Dr HOUNKPONOU AMOUSSOU-GUENOU Eliane Kayivi Murielle	Cardiologie
18. Dr LALEYE Christel Marie Fortunat Olatumbossum B.I.	Anatomie
19. Dr MIZEHOUN Gbèdécon Carmelle.....	Nutrition
20. AGBOKPONTO Janvier Engelbert.....	Chimie Analytique
21. Dr ASSANHOU Assogba Gabin.....	Pharmacie Galénique
22. Dr AZA-GNANDJI Guy-Gérard.....	Psychiatrie
23. Dr BAGLO Dédé Priscillia Tatiana.....	Hématologie Biologie
24. Dr GOUKODADJA Oswald.....	Traumatologie Orthopédie
25. Dr SOSSA Jean	Urologie

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

ASSISTANTS

1. Dr VIGNON Cyprien Kossi.....	Chirurgie Générale
2. Dr LANKPEKO AFFOLABI Clémence M.	Pédiatrie et Génétique Médicale
3. Dr YAKOUBOU YOBO Annatou	Pédiatrie et Génétique Médicale
4. Dr VIGNON Koffi Rodolphe	Hépato-Gastroentérologie
5. Dr AMONLES Yves D.	Psychiatrie
6. Dr HOUESSOU ENIANLOKO TCHIAKPE Nicole Zinhoué	Pédiatrie
7. Dr HOUNDETOUNGAN David Gilles.....	Biophysique
8. Dr DADJO Kinski Aumar.....	Traumatologie Orthopédie
9. Dr HOUEZE Richard Ghislain Constantin.....	Neurologie

Le Doyen,

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

Professeur Josué Dejinnin Georges AVAKOUDJO

Action de grâce

« Bénis le Seigneur, ô, mon âme ;
Seigneur mon Dieu tu es si grand !
Revêtu de magnificence »

« Tout cela, ta sagesse l'a fait »

Psaume 103, versets 1 et 24

Dédicaces

A mon Père

Tu m'as appris rigueur et assiduité, transmis passion et vertus. Merci pour l'amour, la bonté, les sacrifices. Père, enseignant, mentor, ce travail est la concrétisation de nombreuses années de dur labeur. J'espère qu'il saura rendre hommage au grand homme que tu es. Que le Tout-Puissant te comble de ses grâces.

A ma Mère

« Iyami », ce travail est le résultat de la foi que tu m'as transmise, de ton abnégation et de ton courage. Puisse le Seigneur te combler de ses grâces et t'élever au-delà de tes espérances.

A mes frères, Ishola, Bolarin, Babatundé

Grandir à vos côtés est une immense source de joie. Je suis extrêmement fier de vos accomplissements et je suis heureux des valeurs familiales que nous cultivons. Puisse Dieu nous garder toujours unis.

A mes sœurs Nadège, Coralie, Perside.

Valeureuses guerrières, de notre si belle famille, vous êtes le ciment. Merci pour vos prières et vos conseils.

A mes neveux, Olamidé et Abisola ainsi qu'à ma nièce Folashadé

Votre sourire et vos loufoqueries font vite oublier les tracas du quotidien. Que le Seigneur vous protège et que son esprit fasse grandir en vous ses dons.

A ma deuxième famille, Ambroisine MAYE épouse NAHUM, Diolinda et Eric NAHUM

Avoir une famille aimante est une grâce. J'ai le bonheur d'en avoir deux, une biologique et une de cœur. Chère famille NAHUM, votre présence à mes côtés est une immense joie. Que Dieu vous bénisse.

A mon défunt deuxième Père, Alain NAHUM

Incommensurable aurait été ma joie de te revoir, dans l'un de tes si beaux costumes, affichant ce sourire qui te distinguait de tous. Mais je suis persuadé que du monde qui est le tien, tu veilles continuellement sur ta famille et partage les évènements de notre quotidien. Reçois cette dédicace comme un témoignage de la reconnaissance que te porte le jeune homme que tu as amené à la FSS ce 25 janvier 2016 pour sa toute première rentrée universitaire.

A tous mes oncles, tantes, cousins, cousines des familles LALEYE et TOUDONOU

Ce travail est le résultat de vos prières incessantes. Que Dieu le Tout-Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A mes valeureuses mamans du groupe « GES femmes nobles »

Ce travail est la concrétisation du soutien indéfectible que vous m'avez accordé ainsi que de vos prières. J'espère qu'il vous rendra fier de votre « enfant GES ». Que le Seigneur vous protège et vous donne santé et longévité.

A Karen ADJAKIDJE

Pardonne-moi pour les absences répétées, les mots manqués, l'attention pas assez prouvée. Du début à la fin, dans les bons comme les mauvais moments, tu as fait preuve de patience. Je prie Dieu de te bénir, te combler de grâces et te protéger. Je prie aussi que nos projets personnels et professionnels, se réalisent et coïncident.

Remerciements

Au Docteur Marius ADJAGBA

Les mots ne pourront jamais exprimer la profondeur de mon respect, ma considération, ma reconnaissance. Merci pour les enseignements, les précieux conseils et le soutien indéfectible.

Au Professeur ADJOBIMEY Tomabu

Profonde est ma gratitude envers vous pour votre accompagnement tout au long de ce travail. Merci pour la disponibilité et l'accessibilité dont vous faites preuve.

Au Personnel du Laboratoire de Cytogénétique et de Biologie moléculaire de la FSS

Vous faites au quotidien preuve d'une dynamique exceptionnelle. Merci pour cette fructueuse collaboration. Ce travail est autant le mien que le vôtre.

Au Personnel du service d'hépato-gastro-entérologie du CNHU-HKM

Les efforts que vous fournissez pour le bien-être des patients qui vous sont confiés sont énormes. Merci pour l'accueil, la convivialité et les conseils.

Au personnel de l'Antenne Départementale Atlanlique-Littoral de l'ANTS

Votre accueil, votre sympathie et votre participation active ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Merci pour la noble mission que vous accomplissez pour la nation béninoise.

Aux participants de cette étude

Merci pour la confiance placée en ma personne. Vous êtes le socle de ce travail.

A Max ZINSOU DEBALY

Ta disponibilité et ton sens du travail bien fait ont été des points clés dans l'aboutissement de ce travail. Merci pour le travail abattu.

A la Fondation Vallet

Recevez ma profonde gratitude pour cette généreuse bourse qui m'a été octroyée toutes ces années et pour tous les efforts consentis pour l'accès des étudiants en médecine à des ressources documentaires de qualité.

A mes amis du groupe BSBI (Bloc Soudé pour le Buching Intensif)

Mes premières années dans cette faculté, je les ai passé à vos côtés. Merci pour ces moments d'apprentissage intense que nous avons partagé.

Belle carrière à nous !

Au Telos 335, mon groupe de stage interné

Nous avons commencé l'aventure de la sixième année de médecine à 22, terminé à 23 et aujourd'hui nous sommes 24. Merci pour les moments inoubliables et la solidarité.

Plein épanouissement personnel et professionnel à tous !

Hommages

A mon directeur de thèse, le Professeur Jean SEHONOU

Cher Maître, vous êtes pour nous un modèle de détermination et d'abnégation au travail bien fait. C'est un grand honneur que vous nous avez fait, en acceptant de diriger ce travail. Votre rigueur dans la simplicité, et votre sens du détail montre la valeur de l'homme de science et du médecin que vous êtes.

Profonde gratitude.

A mon codirecteur de thèse, le MCA Simon AZONBAKIN

Cher Maître, votre simplicité et votre sens du travail bien fait nous ont poussé à vous soumettre la codirection de ce travail. Votre oui spontané, vos conseils et votre accompagnement ont forcé notre admiration et notre respect. Vous êtes pour nous un guide et un exemple à suivre. Puisse ce travail refléter votre rigueur scientifique.

Profonde gratitude.

Au Président de notre jury de thèse, Professeur Victor YAO

Votre grandeur nous a toujours marqué durant nos années de formation. C'est une grande joie pour nous, de savoir que vous avez accepté de présider notre jury de soutenance de thèse. Vos conseils et recommandations nous aideront à améliorer la qualité de ce travail.

Hommages respectueux.

Aux Honorables membres de Jury, Professeur SOPOH Ghislain et MCA KPOSSOU Raïmi

Nous vous adressons nos remerciements pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à notre travail en acceptant de le juger. Nous sommes convaincus que votre contribution nous aidera à parfaire ce travail. Chers Maître, recevez ici l'admiration et l'estime que nous vous portons.

Sincère reconnaissance.

A tous nos Maitres de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou

En reconnaissance de la qualité de la formation et des valeurs humaines que nous avons reçu de vous, acceptez chers Maîtres, notre profonde gratitude.

Hommages mérités.

Liste des abréviations et des sigles

Ac antiHBc : Anticorps anti-HBc

Ac antiHBe : Anticorps anti-HBe

Ac anti-HBs : Anticorps anti-HBs

AD-ANTS Atlantique-Littoral : Antenne Départementale Atlantique-Littoral de l'Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNccc : ADN circulaire covalent clos

ADNrc : ADN relâché circulaire

AFP : Alpha Fœto-Protéine

AgHBe : Antigène HBe

AgHBs : Antigène HBs

ALAT : Alanine Amino-Transférase

ANTS : Agence Nationale pour la Transfusion sanguine

APRI : ASAT to Platelets Ratio Index

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messager

ASAT : Aspartate Amino-Tranférase

BDS : Banque De Sang

CCL3 : Ligand 3 de la chimiokine

CEF : Cellules étoilées du foie

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CSF-1 : Facteur de Stimulation des Colonies de macrophages

dl : Decilitres

EH : Elasticité Hépatique

ELISA : Enzyme-linked immunoabsorbent assay

GGT : Gamma Glutamyl Transpeptidase

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages)

HBSP : "Hepatite B spliced protein"

HLA : Human Leucocyte Antigen

HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycans

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

kPa : Kilopascal

LT : Lymphocytes T

miARN : micro ARN

NK : Natural Killer

NTCP : Sodium Taurochlorate Co-Transporting Peptide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : Open Reading Frame

PAL : Phosphatases Alcalines

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaine)

PEV : Programme Elargi de Vaccination

rs : Reference SNP

SNP : Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme mononucléotidique)

TDM : Tomodensitométrie

TGFβ : Tumor Growth Factor β

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor (Facteur de nécrose tumorale)

TP : Taux de Prothrombine

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VHD : Virus de l'hépatite D

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	:	les transcrits viraux, leur promoteur et leur devenir	17
Tableau II	:	mécanisme d'action des cytokines à activité antivirale directe ……..……..…….	28
Tableau III	:	correspondance des scores Fibrotest® et Actitest® avec les stades METAVIR ...……..……..……..	33
Tableau IV	:	nombre d'allèles répertoriés pour les principaux loci du système HLA ……..……...……..…..	44
Tableau V	:	répartition des patients suivant les classes d'âge ..…..…	73
Tableau VI	:	paramètres de position et de dispersion des concentrations de cytokine (pg/ml) chez 28 cas …...….	79
Tableau VII	:	odds ratios cas témoins et intervalles de confiance déterminés indépendamment du mode de transmission des allèles ……...…….….	82
Tableau VIII	:	odds ratios cas-témoin et intervalles de confiance pour chaque allèle selon un modèle dominant ……..……	82
Tableau IX	:	odds ratio cas-témoin et intervalles de confiance pour chaque allèle selon un modèle récessif ……..……..…..	83
Tableau X	:	odds ratios cas-témoins selon un mode codominant …..	84
Tableau XI	:	moyenne et médiane de concentration (pg/ml) de cytokines en fonction du génotype (CC et CT) …..…...	86
Tableau XII	:	comparaison des odds ratio obtenu dans notre étude avec ceux d'études réalisées en Chine ..……..…	97
Tableau XIII	:	comparaison des odds ratio obtenu dans notre étude à ceux des travaux sur population caucasienne d'Europe de l'Ouest ...……..……..……	98

Liste des figures

LISTE DES FIGURES

Figure 1	:	vue antérieure du foie……	8
Figure 2	:	vue postéro-inférieure du foie……..	9
Figure 3	:	coupe histologique du foie montrant un lobule hépatique…	11
Figure 4	:	représentation de la structure du virus de l'hépatite…….	12
Figure 5	:	particules virales en microscopie électronique…….	13
Figure 6	:	structure du génome du VHB et transcrits……	14
Figure 7	:	cycle du VHB……	18
Figure 8	:	répartition géographique des différents génotypes du VHB selon les données du CDC et prévalence de l'Ag HBs…….	20
Figure 9	:	activation de la réponse immunitaire innée antivirale……..	24
Figure 10	:	structure des récepteurs du CMH de classe I……	41
Figure 11	:	structure des récepteurs du CMH de classe II……...	42
Figure 12	:	voies d'apprêtement des peptides antigéniques……	43
Figure 13	:	principe de l'amplification génétique par PCR…….	58
Figure 14	:	courbes d'amplification……	59
Figure 15	:	principe de la technique de dosage Luminex®Xmap……..	62
Figure 16	:	courbe standard pour la cytokine MCP-1 (CCL2)……	65
Figure 17	:	répartition des sujets selon les ethnies……..	74
Figure 18	:	répartition des sujets selon la ville de résidence……...	74
Figure 19	:	consommation de tisane chez les sujets du groupe cas…….	75
Figure 20	:	répartition des sujets du groupe cas selon l'étape de l'histoire naturelle de l'infection……...	76
Figure 21	:	niveau de fibrose hépatique chez les porteurs chroniques du VHB…….	77
Figure 22	:	répartition globale (cas + témoins) des génotypes ……...	80
Figure 23	:	répartition des sujets du groupe cas selon le génotype ……	80
Figure 24	:	répartition des sujets du groupe témoin selon le génotype...	81

Par délibération, la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou a arrêté que les opinions émises dans cette thèse n'engagent que son auteur.

Sommaire

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1-GÉNÉRALITÉS

2-CADRE ET MÉTHODE D'ÉTUDE

3-RÉSULTATS

4-DISCUSSION

CONCLUSION

SUGGESTIONS

RÉFÉRENCES

ANNEXES

Introduction

Le foie, carrefour métabolique majeur, est un organe vital par excellence pouvant être la cible de diverses pathologies, dont l'infection au virus de l'hépatite B. Cette affection est un problème de santé publique par sa prévalence et son évolution possible vers des complications engageant le pronostic vital : c'est le cas de la cirrhose et du carcinome hépatocellulaire. Cette évolution serait la résultante d'une interaction entre des facteurs liés à l'hôte (âge de survenue de la contamination, sexe masculin, condition d'immunodépression, etc.) et d'autres liés au virus [1, 2]. Néanmoins, ces facteurs de risques évoqués ne peuvent à eux seuls expliquer tous les cas de portage chronique du virus. C'est dans l'optique d'explorer de nouvelles pistes que l'hypothèse d'une prédisposition génétique de l'hôte est de nos jours évoquée dans des études réalisées sur des familles [3].

Dans le but d'étayer cette hypothèse, il prime d'analyser les mécanismes de défense de l'organisme contre les germes intracellulaires en général et les virus en particulier. Il s'agit des composantes innées et spécifiques de l'immunité. L'activation de la réponse immunitaire spécifique nécessite la présentation de déterminants antigéniques viraux reconnus par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) aux lymphocytes T CD4 naïfs. Cela passe par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Les régions du génome humain (nommées HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) codant pour ces molécules du CMH II sont les plus susceptibles aux variations d'un individu à l'autre [4]. Cette variabilité génétique dans le CMH II pourrait expliquer les différences de réponse immunitaire de l'hôte. Quatre variations situées dans ces régions et portant sur des nucléotides uniques (rs2856718, rs9275572, rs3077 et rs92773) ont présenté une forte différence de fréquence entre l'ouest et l'est de l'Afrique. Cela est superposable aux données épidémiologiques de séroprévalence du VHB [5]. Certains d'entre eux ont été étudiés afin de démontrer leur lien avec l'infection au VHB. C'est le cas du gène rs3077 de la région HLA

DPA1 [6–8]. Les études réalisées sur ce variant ont permis de le décrire comme « un déterminant majeur de la clairance du VHB » [9, 10].

Par ailleurs, une fois la réaction immunitaire antivirale engagée, de nombreux médiateurs sont produits à des fins d'immunomodulation ou d'action antivirale directe, notamment les cytokines. Leur implication lors des diverses phases de l'infection au VHB a été longtemps documentée. Cependant, aucune étude n'a tenté de corréler les prédispositions génétiques à la production de cytokines lors du portage chronique du VHB.

Au Bénin, avec une séroprévalence estimée à 6% en 2019 , l'infection par le VHB est la principale cause de cirrhose hépatique et de cancer primitif du foie [11]. Mais en dehors du train de variation est-ouest précédemment évoqué, il est noté une insuffisance d'étude démontrant un lien formel entre le variant rs3077 et le passage à la chronicité d'une infection par le VHB en population africaine en général et Béninoise en particulier.

Le variant rs3077 est-il lié au développement d'un portage chronique du VHB ? Existe-t-il des différences de production de cytokines d'un génotype à l'autre du rs3077 chez les porteurs chroniques du VHB ?

L'hypothèse de recherche de la présente étude est : « le variant génétique rs3077 influe sur le passage à la chronicité de l'infection au VHB en modifiant le niveau de production de cytokines antivirales ».

Objectif général

Etudier les facteurs de risque et les effets du polymorphisme du gène rs3077 dans le portage chronique du VHB à Cotonou.

Objectifs spécifiques :

- Déterminer les facteurs de risque présentés par les sujets porteurs chroniques du VHB ;
- comparer la répartition du variant rs3077 du HLA-DPA1 entre les sujets porteurs chroniques du VHB et ceux non-infectés ;
- comparer les taux de production de cytokines en fonction du génotype rs3077 présenté par les porteurs chroniques du VHB.

1- Généralités

1-1- Définitions

Portage chronique du virus de l'hépatite B (VHB)

La définition du portage chronique est dynamique. On considère comme porteur chronique, un individu présentant une persistance du VHB pendant au moins six mois. La nomenclature actuelle réalise une distinction entre « infection chronique » et « hépatite chronique ». Cette différence est basée sur les marqueurs d'inflammation hépatique que sont les transaminases. Ainsi, l'« infection chronique » au VHB est définie comme un portage chronique sans preuve d'inflammation hépatique. L'« hépatite chronique » réalise quant à elle, une persistance du VHB pendant plus de six mois avec élévation des transaminases [12].

Tout au long de ce travail, nous traiterons du portage chronique en général (qu'il s'agisse d'une infection chronique ou d'une hépatite chronique).

Gène

Le gène est le support biologique de transmission des caractères héréditaires. Au plan moléculaire, il est généralement conservé dans l'acide désoxyribonucléique (ADN). Celui-ci est un polymère de grande taille de molécules de désoxyribose enchainées successivement par des liaisons phosphodiesters. Chaque molécule de désoxyribose est attachée à une base azotée (adénine, guanine, thymine, cytosine).

Locus

Un locus est la localisation précise d'un gène donné sur une séquence d'ADN.

Allèle

Un allèle est une version possible d'un gène. Il peut différer d'une autre version par sa taille ou par sa composition en nucléotide.

Polymorphisme génétique

Le polymorphisme génétique est la coexistence de plusieurs allèles d'un gène dans une population [13]. En général, on admet qu'un gène est polymorphe lorsque la fréquence de son allèle le moins courant est d'au moins 1% [14].

On parle de polymorphisme mononucléotidique (SNP pour « Single nucleotide polymorphism ») lorsque la différence d'un allèle à un autre du gène ne repose que sur un seul nucléotide.

1-2- Anatomie du foie

1-2-1. Anatomie macroscopique [15]

- **Anatomie de surface**

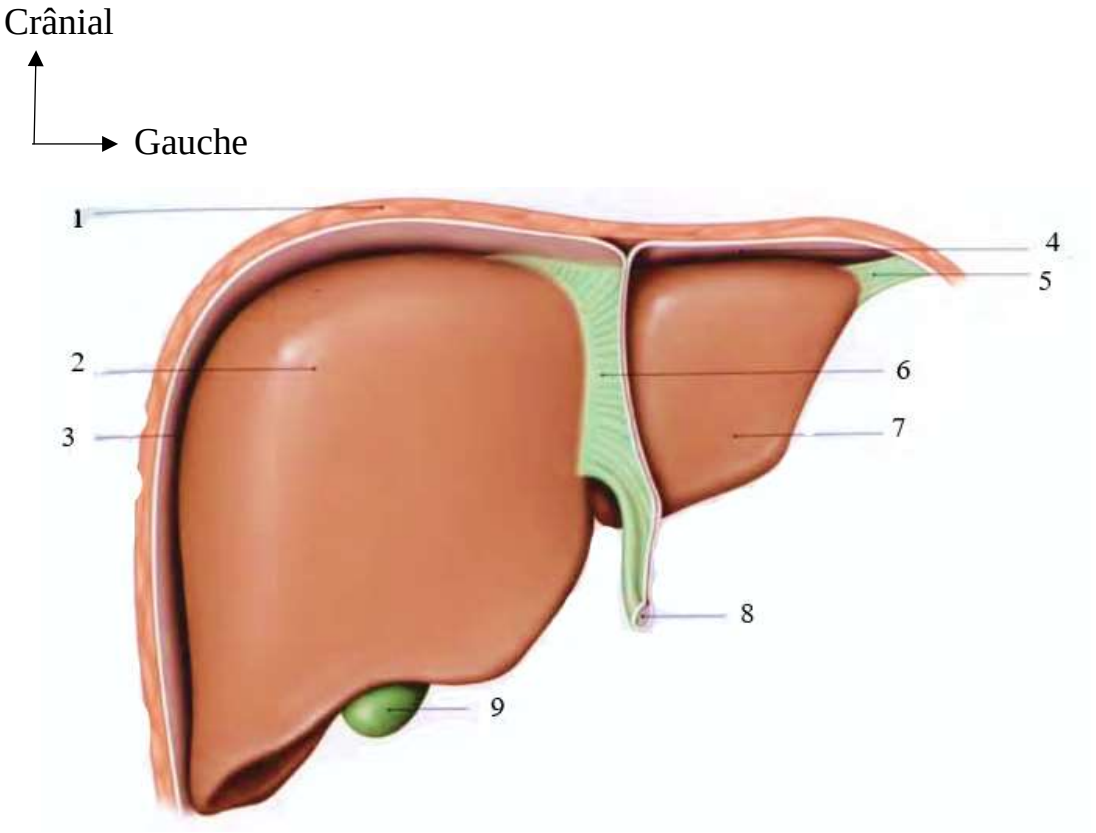
Organe abdominal le plus volumineux, le foie se projette dans l'hypochondre droit et la région épigastrique. Il présente à décrire deux faces. Une face diaphragmatique et une autre viscérale.

La face diaphragmatique, lisse, est solidaire du versant inférieur du diaphragme. Celle viscérale, présente de nombreux reliefs correspondant aux empreintes des structures anatomiques avec lesquelles elle est en rapport. Cette face est le lieu de passage du hile hépatique, ensemble constitué par la veine porte, l'artère hépatique propre (branche terminale de l'artère hépatique commune), et le conduit hépatique commun.

- **Moyens de fixité et subdivision lobaire du foie**

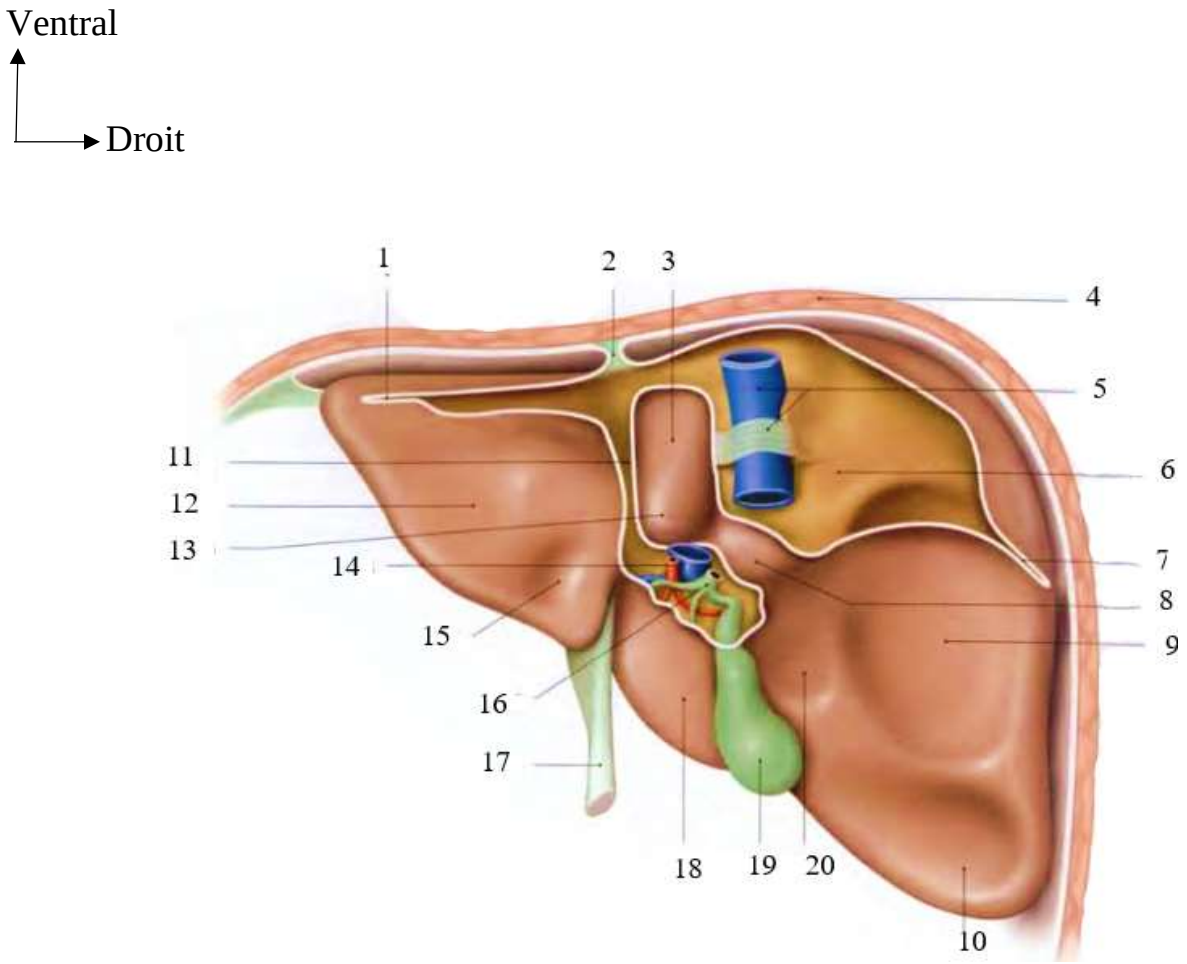
Le foie est fixé à d'autres structures abdominales par un ensemble de ligaments, qui sont des replis du péritoine. Il est notamment relié au diaphragme par le ligament falciforme qui parcourt la face diaphragmatique et est prolongé à la face viscérale par le ligament rond. Ces deux structures ligamentaires servent

de repère à la division schématique de l'organe en deux lobes (gauche et droit). En chirurgie digestive, une subdivision en huit lobes selon l'anatomie interne du foie et son irrigation vasculaire et biliaire est plus usitée (segmentation de Couinaud). Les autres moyens de fixité sont le ligament hépato-gastrique, le ligament hépato-duodénal, les ligaments triangulaires (droit et gauche) ainsi que les ligaments coronaires (antérieur et postérieur).



1- Diaphragme
2- Lobe droit
3- Récessus phréno-hépatique droit
4- Récessus phréno-hépatique gauche
5- Appendice fibreux
6- Ligament falciforme
7- Lobe gauche
8- Ligament rond
9- Vésicule biliaire

Figure 1 : vue antérieure du foie [16]



1- Ligament triangulaire gauche
2- Ligament falciforme
3- Lobe caudé
4- Diaphragme
5- Veine cave inférieure et son ligament
6- Empreinte de la glande surrénale droite
7- Ligament triangulaire droit
8- Processus caudé
9- Empreinte du rein droit
10- Empreinte colique
11- Fissure du conduit veineux
12- Empreinte gastrique
13- Processus papillaire
14- Veine porte et artère hépatique
15- Tubercule omental
16- Conduit hépatique commun
17- Ligament rond
18- Lobe carré
19- Vésicule biliaire
20- Empreinte duodénale

Figure 2 : vue postéro-inférieure du foie [16]

- **Vascularisation hépatique**

On distingue deux contingents vasculaires hépatiques :

- ✓ un contingent afférent composé de l'artère hépatique propre, de la veine porte ainsi que de leurs ramifications successives,
- ✓ et un contingent efférent constitué des 3 veines hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure.

1-2-2. Anatomie microscopique [17, 18]

D'un point de vue histologique, le foie est constitué d'unités fonctionnelles appelées « lobules hépatiques ». Chaque lobule a une forme hexagonale et est constitué d'une veine centrale, dite « veine centro-lobulaire », d'où partent des hépatocytes (cellules fonctionnelles hépatiques) imbriqués formant des travées orientées radialement vers l'extérieur. Dans les coins de ces lobules, se trouvent des espaces interlobulaires (encore appelés espaces portes) contenant des subdivisions terminales de la veine porte, de l'artère hépatique et un conduit biliaire interlobulaire. Ces structures sont importantes à décrire parce qu'elles véhiculent des substances afférentes et efférentes au lobule hépatique. Le conduit biliaire interlobulaire draine la bile produite par les hépatocytes et déversée dans les canalicules biliaires (espaces délimités par les jonctions des hépatocytes). Les subdivisions terminales de la veine porte et de l'artère hépatique convergent en des capillaires sanguins sinusoïdes qui passent entre les travées d'hépatocytes pour rejoindre la veine centrale du lobule. Dans la paroi de ces sinusoïdes se trouvent des cellules étoilées dites « de Kuppfer » qui sont des macrophages hépatiques.

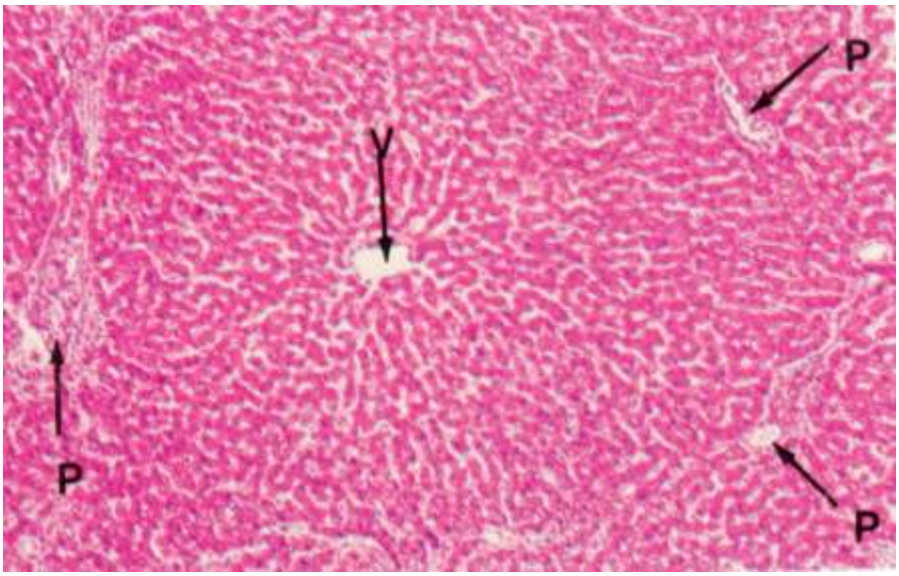


Figure 3 : coupe histologique du foie montrant un lobule hépatique (colorée à l'Hématoxyline-Eosine ; Objectif X 50) [18]

V : Veine centro-lobulaire, P : espace porte

1-2-3. Fonctions du foie

Le foie se retrouve au centre de la plupart des voies métaboliques et assure la régulation de l'homéostasie. Les nombreuses fonctions de cet organe comprennent entre autres, la détoxication des déchets métaboliques et la biosynthèse de la bile, ainsi que des protéines (protéines de transport, facteurs de coagulation, …) et lipoprotéines plasmatiques.

1-3- Virus de l'hépatite B

1-3-1. Structure

Le VHB appartient à la famille des *Hepadnaviridae* et au genre *Orthohepadnavirus*. Il s'agit d'un virus de 42 à 45 nanomètres de diamètre dont le matériel génétique est fait d'acide désoxyribonucléique (ADN) circulaire en deux brins de taille inégale. Ce génome est contenu par une capside polypeptidique doublée d'une enveloppe lipoprotéique. Le virion complet ainsi décrit est encore appelé « particule de Dane ».

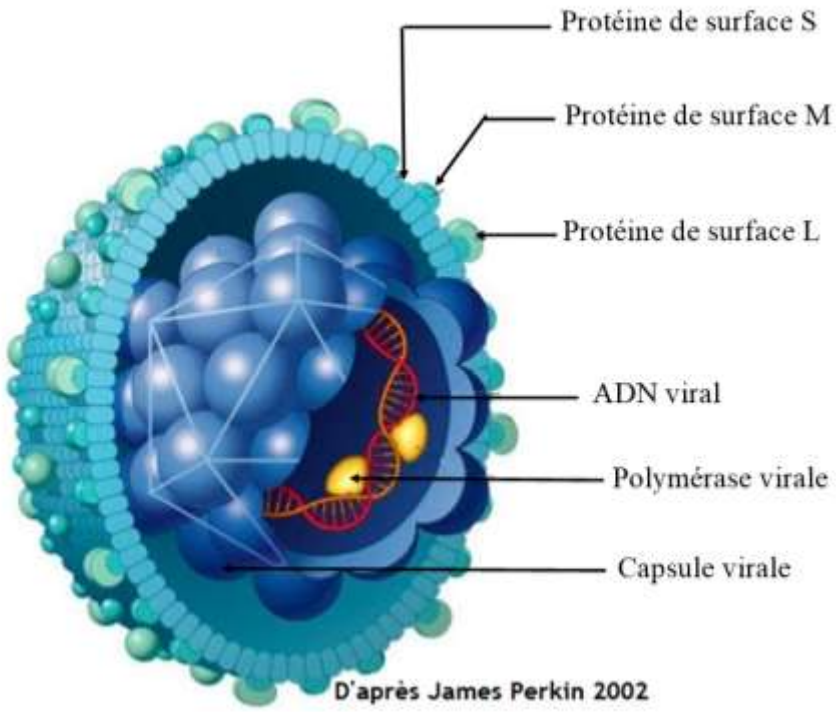


Figure 4: représentation de la structure du virus de l'hépatite B [19]

Au cours de sa réplication, ce virus a la particularité de produire de nombreuses particules subvirales. Celles-ci sont produites en quantité plus importante que les virions complets et semblent être impliquées dans les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire [20]. Au nombre de celles-ci, on distingue deux principales catégories :

- Les particules non infectieuses sphériques ou en forme de filament de 20 nanomètres de diamètre dites « Antigène HBs » (Ag HBs). Anciennement dénommées « antigène Australia », elles ne sont constituées que de protéines de surface virales. Elles ont la capacité de séquestrer les anticorps anti-VHB neutralisant ainsi leur effet.
- Les particules vides dites « genome free » contenant la capside virale et l'enveloppe protéïque, mais pas le génome viral.

De nombreuses autres particules subvirales sont produites mais en proportions plus faibles. L'existence de particules formées de la capside avec en son sein de l'acide ribonucléique (ARN) viral a été récemment mise en évidence [21].

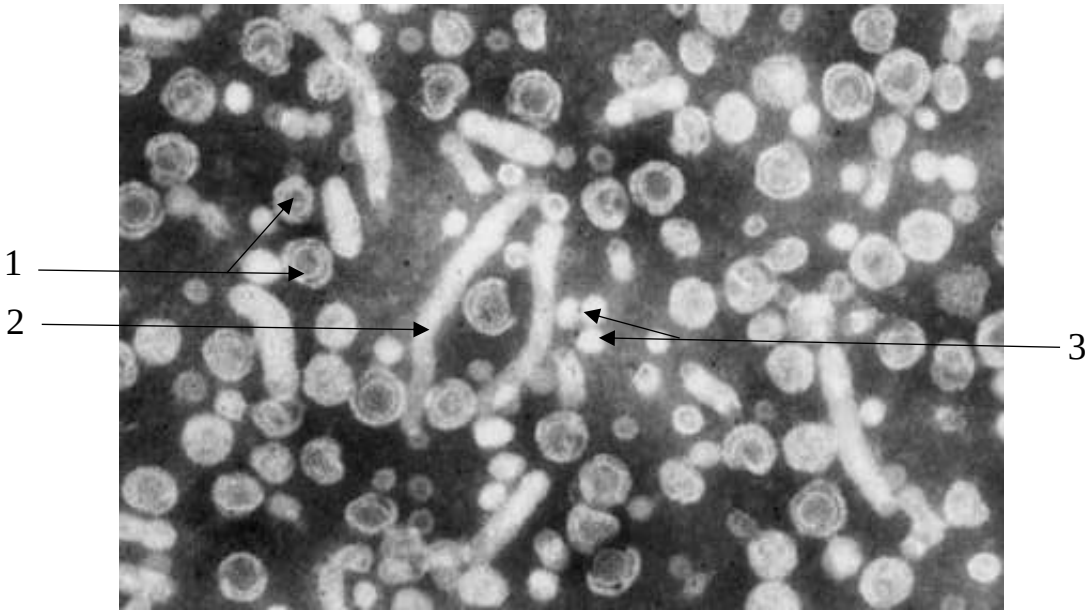


Figure 5: particules virales en microscopie électronique (échelle 50 nm) [3]

1- Virions complets ; 2- Filament (Ag HBs) ; 3- Sphères (Ag HBs)

Organisation génomique du VHB

Le génome du VHB est fait d'ADN circulaire relâché (ADNrc). Les deux brins sont de taille inégale. On dit que cet ADN est « partiellement double brin ». Le brin complet est de polarité négative et celui incomplet est polarisé positivement. Ce génome est subdivisé en 4 cadres ouverts de lecture qui sont partiellement chevauchants :

- un gène pré-S1/pré-S2/S qui code pour les protéines constitutives de l'enveloppe (« large » (L), « middle » (M), « Small » (S), antigène Hbs, etc.) ;

- un gène pré-C/C codant pour la capside contenant l'antigène Hbc ainsi que pour la protéine pré C, précurseur de l'antigène HBe ;
- un gène P codant pour une ADN polymérase ayant une fonction de transcription inverse ;
- un gène X qui possèderait des fonctions de régulation parmi lesquelles figure celle d'intégration du génome viral à celui de la cellule cible [22]. Il existe plusieurs acides ribonucléiques messagers (ARNm) viraux minoritaires produits à partir du gène X. En particulier un ARN qui code pour une protéine non classique : la protéine HBSP (« hepatitis B spliced protein »). Celle-ci semble être impliquée dans la fibrose, l'apoptose et la modulation de la voie du TGFβ (« tumor growth factor β ») [23].

Plus récemment, le gène X a également été décrit comme transactivateur et oncogène potentiel [24].

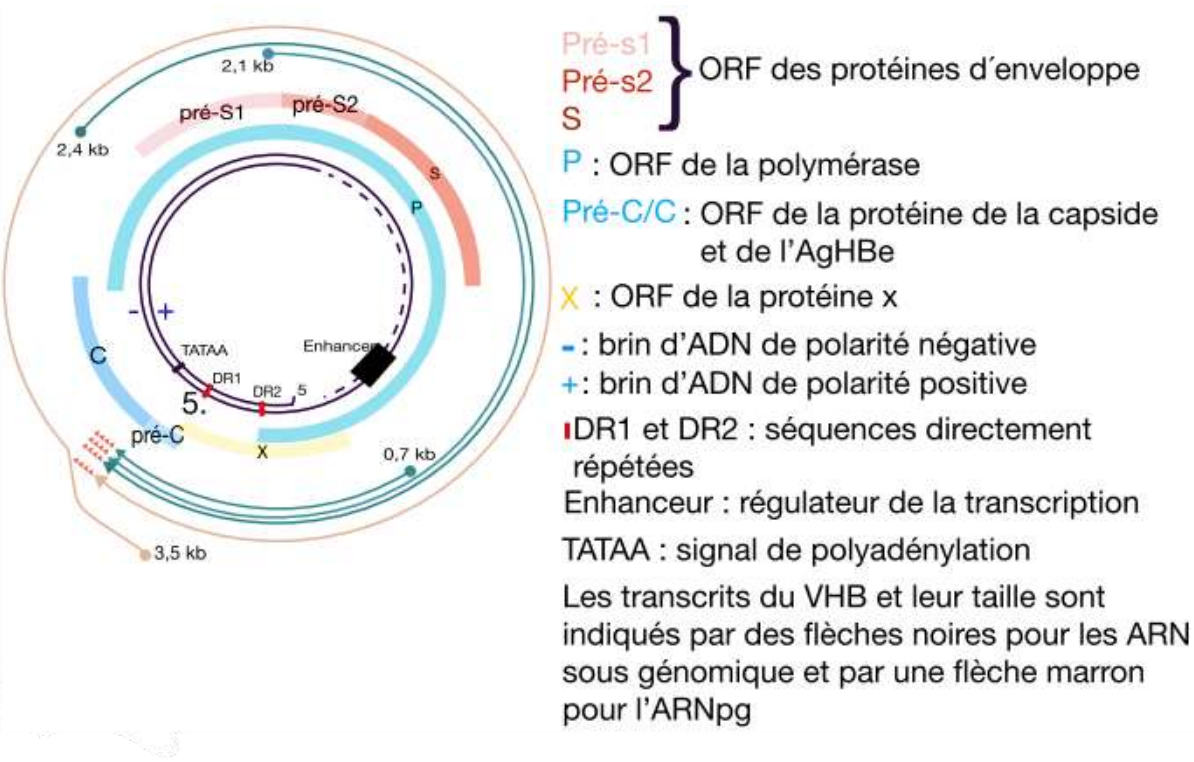


Figure 6 : structure du génome du VHB et transcrits [25]

ORF : « Open reading frame » (Cadre ouvert de lecture)

Variabilité génétique du VHB

Le séquençage de l'ADN du VHB a permis de mettre en évidence l'existence de dix génotypes, dont huit majeurs (nommés de A à H) et deux mineurs (I et J). Le génotype E est le plus fréquemment rencontré en Afrique de l'Ouest [1,25].

1-3-2. Réplication virale

Elle a lieu en plusieurs étapes

- **Attachement à la cellule hôte**

Le VHB est un germe hépatotrope. Son attachement à la cellule hépatique se fait en deux temps. Il se produit d'abord un attachement de faible affinité via les récepteurs HSPG (« Heparan Sulfate Proteoglycans ») [27]. Puis survient l'attachement de forte affinité aux récepteurs NTCP (« Sodium Taurochlorate co-transporting peptides »), transporteurs d'acides biliaires exprimés spécifiquement à la surface des hépatocytes [28, 29]. Cette étape a lieu grâce au domaine pré-S1 de la protéine L de l'enveloppe virale.

- **Internalisation du virus**

Suite à l'attachement de haute affinité, le virus est internalisé par endocytose [25].

- **Libération du génome viral dans le noyau et conversion en ADN circulaire covalent clos**.

Après l'internalisation du virus, la nucléocapside contenant le génome viral est transportée vers le noyau. Cela se réalise grâce à l'interaction entre les microtubules de l'hépatocyte et les séquences de localisations nucléaires de la capside virale [30]. Les nucléocapsides traversent la membrane nucléaire via les importines [31].

Comme précédemment décrit, le matériel génétique du VHB est fait de deux brins circulaires d'ADN de taille inégale (ADNrc). Afin de poursuivre le cycle viral, cet ADNrc est converti en un ADN circulaire covalent clos (ADNccc). Ce dernier sert de matrice pour la synthèse des ARN viraux. L'ADNccc est par ailleurs, la forme sous laquelle le VHB persiste dans les hépatocytes tout en ayant une faible sensibilité à l'action des molécules antivirales.

- **Transcription**

L'ADNccc est transcrit en de multiples ARN messagers viraux. Cette transcription est initiée au niveau des séquences promotrices spécifiques à chaque ARN viral et utilise les mécanismes transcriptionnels de la cellule hôte (ARN polymérase II et protéines nucléaires impliquées dans la réparation de l'ADN). Au terme de cette étape, deux catégories d'ARN viral sont obtenues : les transcrits de taille génomique (3,5 kilo paire de base) et ceux de taille subgénomique (2,1 kpb ; 2,4 kpb ; 0,7 kpb).

- **Traduction, réplication du génome viral et encapsidation des virions**

Les transcrits sont transférés dans le cytoplasme pour la traduction en protéine ainsi que pour la réplication du génome viral.

Une attention toute particulière est à porter au mécanisme de réplication du génome du VHB. En effet, bien qu'il s'agisse d'un virus à ADN, sa réplication ne se fait pas selon un modèle semi-conservatif mais passe plutôt par une transcription inverse. La polymérase virale qui a une activité « reverse transcriptase » est encapsidée avec l'ARN prégénomique (un des transcrits de taille génomique). L'ARN prégénomique sert de matrice à la polymérase pour la synthèse d'un ADNrc. Au terme de la réplication, l'ADNrc encapsidé peut soit acquérir une enveloppe et être sécrété à l'extérieur de la cellule, soit être retourné au noyau pour reconstituer le pool d'ADNccc.

Tableau I : les transcrits viraux, leur promoteur et leur devenir [25]

	Promoteur	Transcrit	Devenir
ARN subgénomiques			
S	PréS/S	2.1kpb *2	Traduction en protéines d'enveloppe S et M
	Pré S2	2.4 kpb	Traduction en protéine d'enveloppe L
X	X	0.7 kpb	Traduction en protéine X
		Autres ARN issus d'épissage alternatif	Formation de particules défectives par encapsidation directe des ARN
			Traduction en HBSP
ARN génomiques			
C	PréC/C	ARN pré-Core (3.5 kpb)	Protéine préC (Précurseur de l'antigène HBe)
			Transcription en protéine de la nucléocapside
P		ARN prégénomique (3.5 kpb)	Transcription en polymérase virale
			Matrice lors de l'étape de transcription inverse

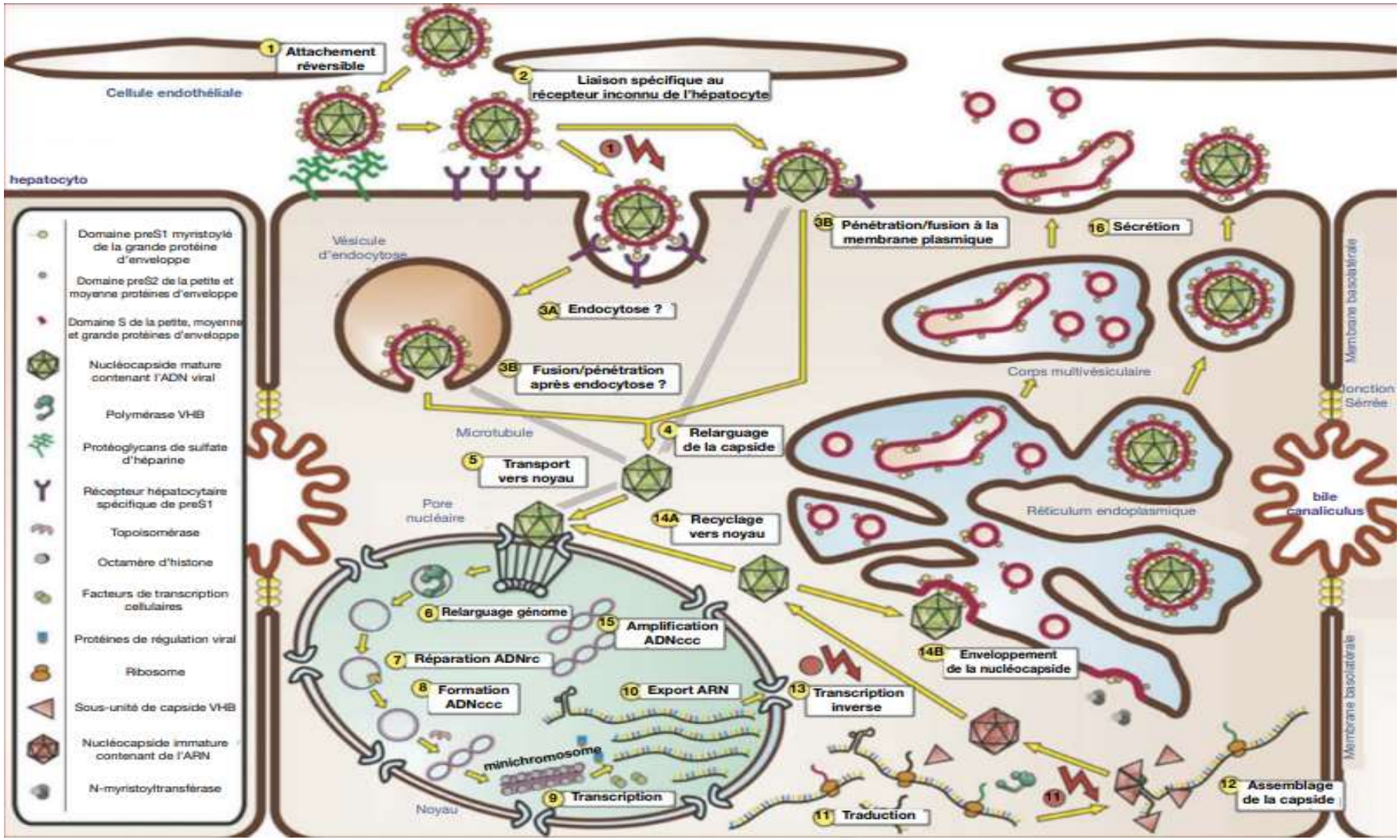


Figure 7 : cycle du VHB [32]

1-3-3. Épidémiologie

1-3-3.1. Prévalence du VHB

L'infection par le VHB est très répandue dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait à 296 millions, le nombre de personnes vivant avec le VHB et à 1,5 million le nombre annuel de nouvelles infections en 2019 [33]. L'infection est endémique mais répandue de manière irrégulière, faisant ainsi délimiter trois catégories de zones géographiques [34] :

- les zones de forte endémicité où plus de 8% de la population générale est porteuse chronique du virus : Afrique subsaharienne, Asie du Sud-est, Extrême-Orient ;
- les zones d'endémicité intermédiaire où la prévalence du portage chronique est comprise entre 2 et 7% : Afrique du Nord, Europe du Sud et de l'Est, Amérique latine, Inde, Japon ;
- les zones de très faible endémicité où la prévalence du portage chronique est inférieure à 2% : Amérique du Nord, l'Europe de l'Ouest et du Nord.

En Afrique, 81 millions de personnes sont infectées de manière chronique. Au Bénin, la séroprévalence du VHB a été estimée à 6% en 2019 [11]. Elle semble être en régression comparée aux 9,9% notés en 2013 chez les nouveaux donneurs de sang [11].

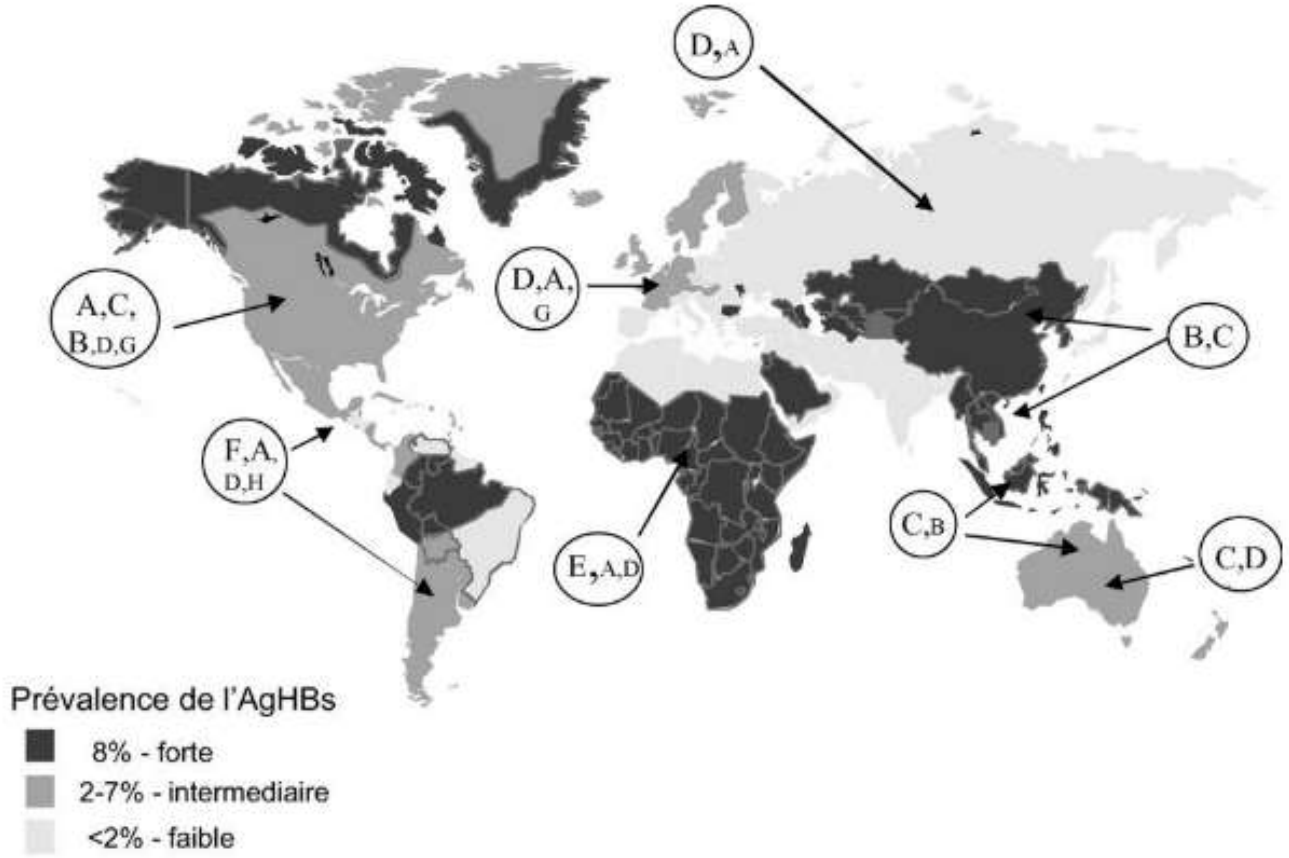


Figure 8 : répartition géographique des différents génotypes du VHB selon les données du CDC (Center Disease Control) et prévalence de l'Ag HBs

[35]

1-3-3.2. Transmission du VHB

Le VHB est présent en plus forte concentration dans le sang mais peut être également détecté dans d'autres liquides biologiques (sécrétions vaginales, sperme, salive, lait maternel, larmes, urine). La concentration du virus associée à la voie d'inoculation déterminent l'efficacité du mode de transmission [36].

Les trois principaux modes de transmissions établis sont :

- la transmission parentérale qui regroupe les expositions percutanées au virus. Il s'agit vraisemblablement de la voie de transmission la plus efficace. Elle a lieu via les transfusions de produits sanguins ; l'utilisation de matériel médical contaminé lors des soins ; l'usage de matériel souillé

lors de la consommation de drogues injectables ou pendant la réalisation de scarifications, de tatouages et de perçages (piercing) [36];

- la transmission sexuelle [36] ;
- la transmission mère-enfant se produisant plus fréquemment au moment de l'accouchement (microtransfusion materno-fœtale, contact avec liquide biologique porteur du virus). Elle peut également survenir par ordre décroissant de fréquence in utero ou au cours d'une amniocentèse. Comparé à une transmission à l'âge adulte, ce mode de contamination expose à un risque significativement élevé de survenue d'une hépatite chronique (90% contre 5 à 10% à l'âge adulte) [34, 37].

Outre les modes principaux, il existe une transmission horizontale non sexuelle chez les personnes vivant dans le même ménage qu'un individu infecté par le VHB. Le risque de contamination par ce mode est plus important chez les enfants avant l'âge de 5 ans [38, 39].

À l'instar de la répartition géographique des génotypes du VHB, on constate une préséance de l'un ou l'autre des modes de transmission. Ainsi, la transmission verticale et celle horizontale prédominent dans les zones à forte endémicité [26, 33].

1-3-3.3. Prévention

Il existe un vaccin procurant entre 98 et 100% de protection contre la maladie. Au Bénin la vaccination contre le VHB a été introduite au programme élargi de vaccination (PEV) depuis 2002 sous la forme de 3 doses injectées respectivement à 6 ,10 et 14 semaines de vie. Depuis le 02 octobre 2020, la vaccination systématique contre l'hépatite B à la naissance, quel que soit le statut sérologique de la mère a été introduite dans le PEV. Ceci vient renforcer les diverses mesures prises pour faire régresser cette endémie.

1-3-4. Immunologie et immunopathogenèse

La réplication virale n'est pas directement cytotoxique pour les cellules hépatiques [40]. Le contact initial de l'organisme avec le VHB peut être totalement asymptomatique [41]. En général, l'immunité innée et celle adaptative jouent un rôle important dans le contrôle et l'élimination d'une infection virale. L'implication de chacun de ces bras de l'immunité varie en fonction de la phase de l'infection par le VHB.

1-3-4.1. Hépatite aigüe

- Immunité innée au cours d'une hépatite aigüe

La réponse immunitaire innée met en jeu des cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages), des cellules libérant des médiateurs inflammatoires (basophiles, mastocytes, éosinophiles), des cellules NK (Natural killer) ainsi que de nombreuses molécules (molécules du complément, cytokines). La reconnaissance initiale des déterminants antigéniques viraux est médiée par les « Toll-like receptor » (TLR) exprimés par les cellules présentatrices d'antigène (monocytes/macrophages, cellules dendritiques). Ils existent en plusieurs types avec des localisations et des fonctions spécifiques. Lorsque ces récepteurs reconnaissent les motifs moléculaires présents à la surface du virion, ils activent une cascade réactionnelle cellulaire. Celle-ci aboutit à la production de médiateurs pro-inflammatoires activant la réponse immunitaire spécifique [42]. Les cellules présentatrices d'antigène produisent également de l'interleukine 12 (IL-12), de l'interleukine 18 (IL-18) ainsi que le ligand 3 de la chimiokine (CCL3). Ces médiateurs activent les cellules NK (« Natural killer ») mais aussi les NK T, sous population de lymphocytes T [37,38]. Les cellules NK agissent soit par cytotoxicité directe soit par production de cytokines inflammatoires [43,44]. Ces cytokines ont soit un rôle de régulation du système immunitaire (IL-3, GM-CSF, CSF 1) soit un effet antiviral direct [40]. Quant aux cellules NK-T, elles produisent tout comme les NK de l'interféron gamma (IFN-ɣ) et du TNF-α

(« Tumor necrosis factor alpha ») afin d'inhiber la réplication virale et de recruter des cellules de l'immunité adaptative [38,41,42]. Les NKT synthétisent aussi les interférons α et β, deux cytokines à activité antivirale directe.

- Immunité adaptative au cours d'une hépatite aigüe

Les lymphocytes T spécifiques, importants effecteurs de la réponse adaptative, jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'infection au VHB [43,44]. Cette réponse passe nécessairement par une étape de présentation des déterminants antigéniques et de sensibilisation des cellules effectrices. C'est la sous population CD4 des lymphocytes T qui reconnait les déterminants antigéniques présentés par les cellules présentatrices d'antigène dans un contexte de CMH de classe II. Ainsi sensibilisés, ces lymphocytes naïfs se différencient en lymphocytes T helper de classe 1 et 2 (LTh1 et LTh2). Les LTh1 produisent de l'interleukine 2 (IL-2) qui active les lymphocytes T cytolytiques (T CD8) mais également de l'IFN-ɣ. Les LTh2 quant à eux synthétisent des cytokines essentielles pour la production d'anticorps par les lymphocytes B et pour l'accumulation sur le lieu de l'inflammation de diverses cellules (monocytes, lymphocytes non sensibilisés, mastocytes) [22]. Les lymphocytes CD8 jouent un rôle central dans la réponse immunitaire en s'attaquant aux cellules infectées par le VHB [49]. Ils agissent par effet cytolytique direct via les perforines (molécules inductrices de perforation de la membrane cellulaire) et/ou en induisant une apoptose via l'interaction entre le récepteur Fas (Situé sur les hépatocytes) et le ligand du Fas (exprimé sur les LT CD8). Les LT CD8 peuvent également agir par des mécanismes non cytolytiques via la production d'IFN-ɣ et de TNF-α.

Ainsi les patients ayant une infection aigüe par le VHB et dont les réponses T CD4 et TCD8 sont multispécifiques et vigoureuses éliminent le virus en fin de compte [51]. À contrario, l'échec de cette réaction conduit à un portage chronique.

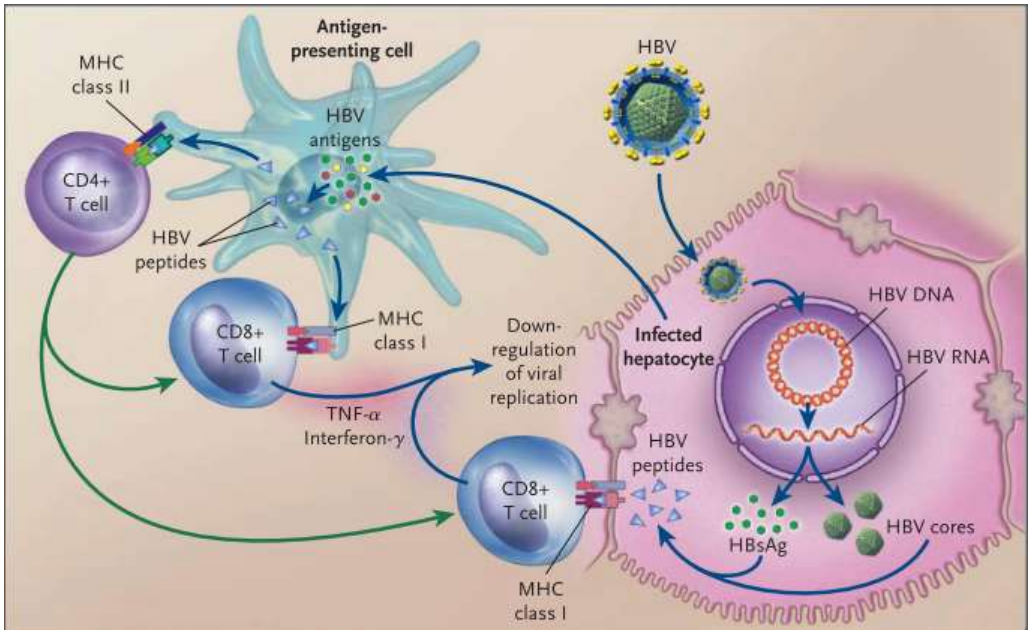


Figure 9 : activation de la réponse immunitaire innée antivirale [3]

Hépatite fulminante

C'est une complication peu fréquente (1%) mais potentiellement mortelle de l'infection par le VHB [47,48]. Elle peut survenir au décours d'une primo-infection au VHB, lors d'une réactivation virale ou en cas de surinfection par d'autres virus hépatotropes humains (VHC, VHD, VIH, CMV). Les raisons de cette évolution fulminante ne sont pas bien comprises. Elle pourrait être le résultat d'une réponse immunitaire disproportionnée de l'hôte entrainant des lésions de nécrose hépatique. Cette réponse excessive ferait spécialement intervenir les lymphocytes T CD8 [54]. Aussi, l'âge avancé de l'hôte, la prise d'alcool, de médicaments hépatotoxiques ou de drogues et les conditions d'immunodépression sont autant de facteurs favorisant la survenue d'une hépatite fulminante. Certains facteurs viraux sont également incriminés. C'est le cas des variations génétiques du VHB dans les promoteurs pré-core et core qui entraineraient une réplication virale accrue [51,52].

1-3-4.2. Le portage chronique

Les mécanismes par lesquels le VHB échappe à la réponse immunitaire et aboutit à une infection chronique sont à ce jour très investigués. Le portage

chronique résulterait somme toute, d'une interaction entre des facteurs liés à l'hôte et au virus.

Les facteurs liés au virus sont entre autres :

- le mécanisme transcriptionnel viral: l'ADNccc du VHB est transcrit dans le noyau de la cellule hôte en ARNm viraux. Ceux-ci étant polyadénylés, et coiffés ressemblent aux transcrits cellulaires normaux de l'hôte et sont donc difficiles à reconnaitre par les récepteurs de l'immunité innée [54] ;
- les mutations tolérogènes pré-core [57] ;
- l'inhibition de la réponse immunitaire adaptative par les protéines virales :
    - ✓ Inhibition de l'induction des interférons de type 1 (dont l'IFNɣ) par la protéine X,
    - ✓ Inhibition de la production d'IFN-β par la polymérase virale,
    - ✓ Séquestration des anticorps anti-VHB par l'AgHBs.

Les facteurs liés à l'hôte comprennent :

- l'âge de survenue de l'infection [58]
- l'état immunitaire du sujet (chez les personnes immunodéprimées, 20 à 40 % des infections aigües passent à la chronicité)
- les prédispositions génétiques

Tous ces facteurs concourent chez les sujets porteurs chroniques du VHB à :

- une réduction significative des réponses des lymphocytes T CD4 et CD8 [59] ;
- une hyporéactivité généralisée des lymphocytes T CD4 [60]. Celle-ci pourrait être attribuée à une altération fonctionnelle des cellules

dendritiques infectées par le VHB avec une production réduite d'IFN ɣ, de TNF α et d'IL 12 [61] ;

- une augmentation de l'expression des molécules de mort programmée par les lymphocytes T spécifiques du VHB [62] ;
- un niveau inférieur de TLR de type 2 et une faible activité des cellules NK [63, 64].

La fibrose hépatique

Elle est due à une fibrogenèse prolongée [65]. Celle-ci est la résultante d'une activation de cellules fibrocompétentes dont les principales sont les cellules de Kupffer [66]. Cette activation est le fait de mécanismes complexes impliquant entre autres des protéines virales (protéine HBx) et les hépatocytes infectés via des médiateurs tels que le TGF β, le TNF α, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et l'angioprotéine 2. La finalité est une destruction de l'architecture hépatique normale où le parenchyme est remplacé par du tissu fibreux. Au cours de la fibrose, la matrice extracellulaire se dépose spécifiquement à l'interface entre la circulation sanguine et les hépatocytes ; et des changements structurels précoces s'y produisent. Ces altérations conduisent à une « capillarisation » des sinusoïdes hépatiques. La barrière sinusoïdale se resserre, limitant ainsi les échanges bidirectionnels entre le flux sanguin et les hépatocytes et provoquant leur nécrose. Une régénération hépatique peut survenir lors de l'installation de la fibrose et contribuer à l'oncogenèse hépatique [65]. Le stade critique de ce processus est la cirrhose, complication survenant en 5 ans chez 8 à 20% des patients porteurs chroniques du VHB présentant l'antigène HBe [67].

La cirrhose est caractérisée par des bandes de tissu fibreux reliant la veine porte et les structures mésenchymateuses centro-lobulaires et séparant les nodules hépatocytaires d'aspect normal.

Carcinome hépatocellulaire (CHC)

Il s'agit d'une tumeur maligne primitive du foie. En général, l'infection par le VHB est la cause de 60 à 80 % des carcinomes hépatocellulaires [68]. Plusieurs facteurs concourent à la carcinogenèse médiée par le VHB, notamment :

- les propriétés oncogènes de certaines protéines virales (Protéine HBx et AgHBs) ;
- l'intégration du génome du VHB à l'ADN de la cellule hôte à l'origine d'une modification de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur des miARN et des oncogènes ;
- les mutations oncogènes dans le génome du virus ;
- le potentiel oncogène de certains composants du système immunitaire de l'hôte (IL-6, IL-22, TNF α, TGF β, chimiokine CCL 22, TGF 1) [69].

1-3-5. Les cytokines intervenant dans l'infection par le VHB

Les cytokines sont des constituants essentiels de la réponse immunitaire. Des études réalisées sur des chimpanzés suggèrent que la production de cytokines à activité antivirale via l'immunité innée et celle adaptative contribue à la réduction du niveau d'ADN du VHB et ceci avant même que la réponse médiée par les lymphocytes T ne soit induite [42]. Les mécanismes antiviraux des cytokines sont nombreux. Elles assurent des fonctions de régulation de l'immunité (activation, recrutement, signal de différenciation, …) mais possèdent aussi une activité antivirale directe [70]. Le tableau suivant donne un aperçu des connaissances actuelles sur les cytokines à activité antivirale directe.

Tableau II : m écanisme d'action des cytokines à activité antivirale directe

	Mécanisme
IL-6 et IFN-α	Inhibition de l'entrée du virus dans les hépatocytes
IFN-α, IL-6, IL-1β	Régulation de la transcription virale par modifications épigénétiques
IFN-α, IFN-ɣ, IFN-λ, TNF-α, TGF-β	Dégradation de l'ADNccc
IL-4, IL-6, TGF-β, IFN-α, IFN-β, IL-1β	Contrôle transcriptionnel
IFN-α, IFN-β, IFN-λ, IFN-ɣ, TNF-α, IL-1β	Ciblage post transcriptionnel de l'ARN et altération de la stabilité de la capside
IFN-α, IFN-ɣ	Altération de la traduction des protéines virales
IFN-α	Inhibition de la sécrétion virale

1-3-6. Les outils de diagnostic et de suivi

De nombreux outils sont utilisés dans le diagnostic et le suivi de l'infection par le VHB. Nous aborderons ceux qui sont les plus couramment utilisés dans notre contexte.

1-3-6.1. La biologie

- **Les tests virologiques classiques** [71]

Ils regroupent des marqueurs sérologiques et un marqueur moléculaire

- ✓ Tests sérologiques de détection des antigènes du VHB et des anticorps anti-VHB

Ils sont basés sur l'utilisation de tests immuno-enzymatiques de type ELISA (« enzyme-linked immunosorbent-assay »). Par ce procédé, il est possible de détecter :

- l'antigène HBs (Ag HBs) : C'est le principal marqueur diagnostic de l'infection par le VHB ;
- l'anticorps anti-HBs (Ac anti-HBs) : Il apparait au cours d'une infection résolutive ou au décours de la vaccination. C'est un marqueur d'immunisation ;
- l'antigène HBe (Ag HBe) et l'anticorps anti-HBe (Ac anti-HBe) : Ils témoignent de la réplication virale, de l'infectivité et sont des marqueurs de réponse au traitement ;
- les anticorps anti-HBc : Les anticorps anti-HBc de type IgM sont significativement détectés au cours d'une infection aigüe, mais également à un faible titre au cours d'un portage chronique. Ils peuvent réapparaitre en cas de réactivation du VHB. Les IgG anti-HBc ne témoignent que d'un contact avec le virus. En pratique, ils ne sont pas dosés. Le dosage des anticorps anti-HBc totaux est donc couplé à celui des IgM anti-HBc.

✓ Détection et quantification de l'ADN du VHB

Les techniques les plus récentes consistent en une réaction de polymérisation en chaine en temps réel. Cette technique a une grande sensibilité.

- **Le bilan hépatique**

Il comprend :

✓ les aminotransférases : Elles sont au nombre de deux (Alanine aminotransférase et aspartate aminotransférase). Elles sont produites par le foie mais également par le cœur, les reins et les muscles. Leur élévation témoigne souvent d'une cytolyse hépatique.

- ✓ les phosphatases alcalines : Leur élévation représente le principal signe de cholestase hépatique [72]**.**
- ✓ les gamma glutamyl transpeptidases (GGT) : Elles sont élevées dans la quasi-totalité des pathologies hépatiques.
- ✓ la bilirubine : C'est un produit de dégradation de l'hémoglobine existant sous deux formes. Une forme libre ou indirecte qui est transportée par l'albumine jusqu'au foie, lieu où elle est transformée en la deuxième forme dite conjuguée ou directe. En pratique, on dose la bilirubine totale et celle conjuguée. L'augmentation de la fraction conjuguée de la bilirubine est plus évocatrice d'une cholestase.
- ✓ le taux de prothrombine : encore appelé temps de Quick, il évalue partiellement la coagulation plasmatique. Puisque celle-ci dépend entre autres de la production de facteurs de coagulation par les hépatocytes, doser le TP est un bon reflet de leur fonctionnement ;
- ✓ le facteur V (Proaccélérine) : c'est un facteur de coagulation produit par les hépatocytes. Sa diminution associée à la baisse du TP témoigne d'une insuffisance de production par les hépatocytes et permet d'exclure une hypovitaminose K ;
- ✓ l'albumine : c'est la principale protéine de transport dans le sang. On peut obtenir l'albuminémie par dosage direct ou par l'électrophorèse des protéines sériques. L'albumine étant produite par le foie, son taux sérique baisse en cas d'insuffisance hépatocellulaire ;
- ✓ le cholestérol : une baisse du taux de cholestérol peut être le fait d'une insuffisance hépatocellulaire.

- **L'alpha fœto-protéine**

C'est une glycoprotéine qui est élevée dans 70 à 95 % des cas de carcinome hépatocellulaire [73].

1-3-6.2. Les outils de morphologie [74]

- **L'échographie abdominale**

Elle donne des informations précieuses sur l'aspect du foie : contours ; dysmorphie ; modification de l'échostructure ; signes d'hypertension portale.

- **La ponction biopsie hépatique avec examen anatomo-pathologique**

C'est la méthode de référence dans l'évaluation de la fibrose hépatique mais également dans le diagnostic du carcinome hépato-cellulaire. Mais son caractère invasif limite son utilisation au profit de techniques non invasives. Les résultats de l'examen anatomo-pathologique de la pièce de biopsie permettent d'évaluer la fibrose (Notée F) et l'activité hépatique (Notée A) par le score METAVIR.

- ✓ A0 : Pas d'activité
- ✓ A1 : Activité minime
- ✓ A2 : Activité modérée
- ✓ A3 : Activité sévère

- ✓ F0 : Pas de fibrose
- ✓ F1 : Fibrose portale sans septa
- ✓ F2 : Fibrose portale avec septa
- ✓ F3 : Fibrose septale sans cirrhose
- ✓ F4 : Fibrose septale avec cirrhose

1-3-6.3. Méthodes non invasives d'évaluation de la fibrose

Elles sont plus couramment utilisées et consistent soit en l'appréciation de marqueurs biologiques de fibrose soit en la mesure de l'élasticité du foie (le plus souvent par élastographie impulsionnelle ultrasonore). Les marqueurs biologiques sont combinés en des scores diagnostiques tel que le score Fibrotest®, le score APRI l'Hepascore, le score FibroMètre.

- **Le score APRI (ASAT to platelet ratio index)**

Les marqueurs biologiques permettant le calcul du fibrotest® étant difficiles d'accès à cause de leur coût, le score APRI reste très utilisé. Il est déterminé à partir de l'ASAT et du taux de plaquettes.

$$\text{Score APRI} = (\text{ASAT} * 100/\text{référenceASAT}) \,/\text{Taux de plaquettes}$$

Un score APRI inférieur à 0,5 signifie qu'il y a 86% de probabilité que le sujet ait une fibrose inférieure au stade METAVIR F2. Lorsqu'il est supérieur à 1,5, il correspond à 88% de probabilité d'un niveau de fibrose supérieur ou égal à F2.

- **Score Fibrotest®**

Il est calculé à partir de cinq paramètres biologiques (haptoglobine, GGT, bilirubine totale, alpha2 macroglobuline et apolipoprotéine A1) ajustés selon l'âge et le sexe. Ce score varie de 0 à 1. Comparé au score APRI, il a pour avantage de ne pas surestimer la fibrose à cause de l'inflammation hépatique puisqu'il ne tient pas compte de l'ALAT. Il donne une estimation beaucoup plus précise. Le taux sérique d'ALAT associé aux cinq paramètres biologiques du fibrotest® définit le score actitest®. Ce dernier permet d'évaluer l'activité nécrotico-inflammatoire hépatique. Le tableau suivant montre la correspondance des scores fibrotest® et actitest® avec les divers stades du score METAVIR.

- **Elastographie impulsionnelle ultrasonore (Fibroscan®)**

Ses principaux atouts sont sa rapidité d'exécution et son accessibilité. Il estime l'élasticité hépatique en mesurant la vitesse de propagation d'une onde ultrasonore dans le foie. Celle-ci est d'autant plus rapide que le foie est dur. En tenant compte de la médiane de 10 mesures, on en vient à une estimation en kilopascal (kpa) de l'élasticité du foie qu'on corrèle au degré de fibrose METAVIR comme suit :

- élasticité hépatique (EH) inférieure à 7,2 kpa : F0-F1
- EH comprise entre 7,2 et 8,1 kpa : F2
- EH comprise entre 8,1 et 10,5 kpa : F2-F3
- EH entre 10,5 et 11 kpa : F3
- EH entre 11 et 14,5 kpa : F3-F4
- EH supérieur à 14,5 kpa : F4

Tableau III : correspondance des scores Fibrotest® et Actitest® avec les stades METAVIR

Fibrotest®							
F0	**F0-F1**	**F1**	**F1-F2**	**F2**	**F3**	**F3-F4**	**F4**
0-0,21	0,22-0,27	0,28-0,31	0,32-0,48	0,49-0,58	0,59-0,72	0,73-0,74	0,75-1
Actitest®							
		A1	**A1-A2**	**A2**	**A2-A3**	**A3**	
		0,30-0,36	0,37-0,52	0,53-0,6	0,61-0,63	0,64-1	

1-3-7. Histoire naturelle de l'infection par le VHB

1-3-7.1. Hépatite aigüe

Après une période d'incubation de 4 à 10 semaines, l'AgHBs devient détectable suivi de près par les anticorps anti-HBc principalement de type IgM [3]. L'ADN viral devient détectable dès le quinzième jour après la contamination [75]. Dans la majorité des cas, on note une guérison spontanée avec disparition de l'AgHBs dans un délai maximal de six mois.

1-3-7.2. Le portage chronique

Le portage chronique survient à l'âge adulte chez moins de 5% des sujets. Mais l'infection passe à la chronicité chez 90% des nourrissons infectés dans la période néonatale et chez 20 à 50 % des jeunes enfants entre 1 et 5 ans [58]. Le portage chronique est un processus dynamique passant par 5 phases non séquentielles [12, 76].

- **La phase d'infection chronique avec positivité de l'Antigène HBe (AgHBe)**

Anciennement appelée phase d'immunotolérance, elle est caractérisée par la détection sérique de l'AgHBe, une charge virale élevée témoignant d'une forte réplication virale mais sans cytolyse hépatique. Le niveau de fibrose et de nécrotico-inflammation est faible.

- **La phase d'hépatite chronique avec positivité de l'AgHBe**

Elle correspond à une phase de clairance immunitaire. Elle se différencie de la précédente par une réplication virale relativement moins importante, mais on y retrouve une élévation du taux sérique d'ALAT et une augmentation des lésions nécrotico-inflammatoires du fait de l'exacerbation de la réaction immunitaire de l'hôte. Le risque d'évolution vers la fibrose et à long terme vers la cirrhose est plus élevé. La majorité des patients auront ensuite une suppression virale soutenue et entreront dans le stade d'infection chronique à AgHBe négatif. Mais certains

n'arrivent pas à contrôler l'infection et passent ainsi à la phase d'hépatite chronique à AgHBe négatif pendant plusieurs années.

- **La phase d'infection chronique à AgHBe négatif**

Anciennement appelée « Portage inactif », elle est caractérisée par une négativité de l'AgHBe avec apparition d'Ac anti-HBe. À ce stade, le taux d'ALAT est normal, et la réplication virale est nulle ou persiste à bas niveau. De rares sujets pourraient avoir entre 2000 et 20000 copies du virus avec l'ALAT normal, une faible activité nécrotico-inflammatoire et un bas niveau de fibrose. La clairance spontanée de l'AgHBs avec séroconversion HBs lors de cette phase est de l'ordre de 1–3 % par an. À l'inverse, environ 4–20 % de porteurs inactifs présentent une ou plusieurs réversions HBe et repassent à la phase de réaction immune [77].

- **La phase d'hépatite chronique à AgHBe négatif**

Elle est caractérisée par l'absence de AgHBe, généralement associée à la génération d'ac anti-HBe. Le plus souvent, ce profil sérologique est attribué à la présence de mutations dans la région pré-C du génome (d'où le terme « mutant pré-C »), qui interfère avec la production de l'AgHBe. Ce stade se manifeste par des fluctuations cycliques de la réplication virale, des transaminases, des lésions nécrotico-inflammatoires et de la fibrose. Elle est associée à de faibles taux de rémission spontanée.

- **La phase de perte de l'AgHBs**

Elle est caractérisée par l'absence d'AgHBs, la présence d'anticorps anti-HBc avec ou sans anticorps anti-HBs détectables. Cette phase est également connue sous le nom d'"infection occulte par le VHB". Dans de rares cas, l'absence d'AgHBs pourrait être liée à la sensibilité du test utilisé pour la détection [78]. Au cours de cette phase, l'ADN du VHB peut être indétectable dans le sang périphérique mais fréquemment détecté dans le foie.

1-3-8. Diagnostic positif d'une infection au VHB

L'infection en elle-même présente peu de manifestations cliniques en dehors des complications (hépatite aigüe grave, cirrhose, carcinome hépato-cellulaire). Elle est généralement diagnostiquée lors de l'exploration d'une cytolyse hépatique ou au décours des complications.

1-3-8.1. Hépatite aigüe

L'hépatite aigüe est asymptomatique dans 90% des cas chez l'enfant de 1 à 5 ans et dans deux tiers des cas chez l'adulte [79]. Elle reste donc très peu diagnostiquée. Elle peut toutefois se présenter sous certaines formes [75].

- **Forme « classique »**

Elle est de présentation similaire aux autres hépatites virales et évolue en deux phases (une phase pré-ictérique et une phase ictérique).

- ✓ Phase pré-ictérique : Elle dure 5 à 10 jours et se manifeste par des signes peu spécifiques. On peut retrouver un syndrome d'altération de l'état général (asthénie, anorexie, amaigrissement) ; une fièvre avec un syndrome grippal ; des signes digestifs (douleur abdominale diffuse ou de l'hypochondre droit, nausée) ; une éruption cutanée urticarienne.
- ✓ Phase ictérique : D'installation progressive en 4 à 8 jours, elle peut durer entre 2 et 6 semaines. On retrouve un ictère cutanéo-muqueux d'intensité variable, avec des urines foncées et des selles pouvant être décolorées, un prurit inconstant, de possibles douleurs de l'hypochondre droit avec une hépatomégalie à la palpation.

- **Forme prolongée** : L'ictère se prolonge au-delà de six semaines.
- **Forme anictérique** : Les signes cliniques de la phase pré-ictérique sont présents mais il n'y a pas d'ictère.

- **Forme cholestatique :** L'ictère est intense et typiquement cholestatique (prurit important, urines foncées, selles décolorées).
- **Forme extra-hépatique :** L'infection peut se manifester au niveau rénal sous la forme d'une glomérulonéphrite extra membraneuse avec dépôt de complexes immuns.

Quelle que soit la présentation d'une hépatite aigüe, la détection sérique de l'AgHBs et d'ac anti-HBc de type IgM confirme le diagnostic.

1-3-8.2. Portage chronique

Le portage chronique est généralement asymptomatique et découvert lors d'un dépistage systématique ou lors de l'exploration d'une élévation des transaminases. Il peut dans une forme extra-hépatique être associé à une périartérite noueuse. En dehors des circonstances précédemment évoquées, la suspicion clinique est le plus souvent faite au décours des complications. La détection de l'AgHBs à deux reprises dans un intervalle de six mois ou sa découverte ponctuelle associée à l'absence d'Ac anti-HBc de type IgM permettent de poser le diagnostic.

1-3-8.3 Diagnostic positif des principales complications de l'infection au VHB

- **Hépatite aigüe grave** [75]

C'est une complication grave de l'infection au VHB. Elle est définie par la baisse du taux de prothrombine en dessous de 50%. Elle peut cliniquement se présenter de deux manières :

- ✓ l'hépatite fulminante qui est définie par la survenue d'une encéphalopathie hépatique dans un délai inférieur à 2 semaines après apparition d'un ictère,
- ✓ et l'hépatite subfulminante diagnostiquée quand l'encéphalopathie hépatique survient plus de deux semaines après l'ictère.

- **Cirrhose** [74]

Le diagnostic de cirrhose est basé sur une combinaison d'arguments cliniques, biologiques et morphologiques que l'on peut regrouper comme suit :

- ✓ Signes de dysmorphie hépatique : À la clinique on a une hépatomégalie à surface antérieure irrégulière dure et à bord inférieur tranchant. L'échographie peut montrer un foie d'échostructure hétérogène, à contour bosselé, hypertrophié à gauche et atrophié à droite avec un élargissement du hile et des sillons hépatiques.
- ✓ Signes d'hypertension portale : Cliniquement on peut observer une ascite, des circulations veineuses collatérales et une splénomégalie. Cette splénomégalie est associée à un hypersplénisme se manifestant à la numération formule sanguine par une thrombopénie. La splénomégalie est également visible à l'échographie où elle est associée à une augmentation du diamètre de la veine porte (>12mm) ; à des voies de dérivation porto-systémiques et un flux hépatofuge (au Doppler). L'endoscopie œso-gastro-duodénale montre des varices œsophagiennes.
- ✓ Signes d'insuffisance hépatocellulaire : Sur le plan clinique, on peut noter des signes cutanéo-phanériens (érythrose palmaire, angiomes stellaires, leuconychie), un ictère et des signes d'hypogonadisme (gynécomastie et dépilation chez l'homme, aménorrhée chez la femme). Les signes biologiques sont non spécifiques et comportent entre autres, une baisse du TP et du facteur V, une hypoalbuminémie et une hyperbilirubinémie à prédominance conjuguée (parfois mixte).

Le diagnostic de certitude est fait par l'examen anatomopathologique d'une pièce de biopsie hépatique qui montre une fibrose annulaire diffuse délimitant des nodules hépatiques d'aspect normal. La biopsie étant invasive et à risque de

complications, on privilégie les méthodes d'évaluation non invasives de la fibrose abordées au point 1-3-6. 3.

- **Carcinome hépatocellulaire (CHC)** [80]

Il est souvent diagnostiqué au décours de la décompensation d'une cirrhose. Il est également suspecté en cas de syndrome tumoral alliant une hépatomégalie douloureuse, une altération de l'état général (asthénie, anorexie, amaigrissement) et une fébricule. Un CHC peut aussi être diagnostiqué lors de l'exploration d'un nodule hépatique suspect à l'échographie.

Le critère diagnostique de référence est l'examen anatomopathologique sur pièce de biopsie. À défaut, on se base sur des arguments biologiques comme l'élévation des marqueurs tumoraux (alpha fœto-protéine principalement) et le syndrome paranéoplasique (polyglobulie, hypercalcémie, hypoglycémie) ainsi que sur l'imagerie. En effet, l'échographie peut orienter le diagnostic en montrant une thrombose porte, laquelle est également visible en Tomodensitométrie (TDM) ou en imagerie par résonance magnétique (IRM). En cas de CHC, on constate à la TDM une lésion spontanément hypodense qui après injection de produit opacifiant apparait hypervascularisée (hyperdense) au temps artériel (« wash in ») avec une chute de contraste au temps portal (« wash out »). Le « Washout » portal est due aux shunts artério-portes intratumoraux. On le retrouve aussi à l'IRM après injection de gadolinium. Avant l'injection, la lésion parait hypo et hyper intense respectivement aux temps T1 et T2.

1-4- Le complexe majeur d'histocompatibilité

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un système présent dans toutes les espèces vertébrées et impliqué dans les phénomènes de reconnaissance des antigènes. Chez l'être humain, le CMH est également connu sous le nom de système HLA (« Human leucocyte antigen »). Il est composé de deux ensembles de gènes (Classe I et II) situés sur le bras court du chromosome 6 codant pour des protéines membranaires dont la fonction première est d'assurer la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T. Cette présentation est une étape clé de la réponse immunitaire adaptative. Les gènes du CMH sont les plus polymorphes du génome humain.

1-4-1. Structure et fonction des protéines du CMH [81]

Les protéines du CMH de classe I et de classe II comportent des sous-unités différentes mais conservent une structure générale assez proche. L'une comme l'autre, possède un sillon extracellulaire liant un peptide.

1-4-1.1. Les protéines du CMH de classe I

Chaque molécule du CMH de classe I est constituée d'une chaine α associée de façon non covalente à une protéine nommée β_2 microglobuline. Cette dernière est codée par un gène situé en dehors des loci du CMH. La chaine α est faite de trois domaines extracellulaires (α1, α2 et α3), d'un domaine transmembranaire et d'un dernier cytoplasmique.

Les domaines α1 et α2 de cette chaine forment deux parois et un sillon pouvant accueillir les peptides antigéniques longs de huit à neuf acides aminés. Le plancher du sillon contient des acides aminés liant les peptides pour les présenter aux lymphocytes T. Les régions variables d'un individu à un autre des protéines du CMH de classe I se situent dans les domaines α1 et α2. Ces variations sont susceptibles d'influer sur la capacité de lier des ensembles distincts de peptides.

Quant au domaine α3, il est constant et contient un site de liaison au corécepteur CD8 des lymphocytes T.

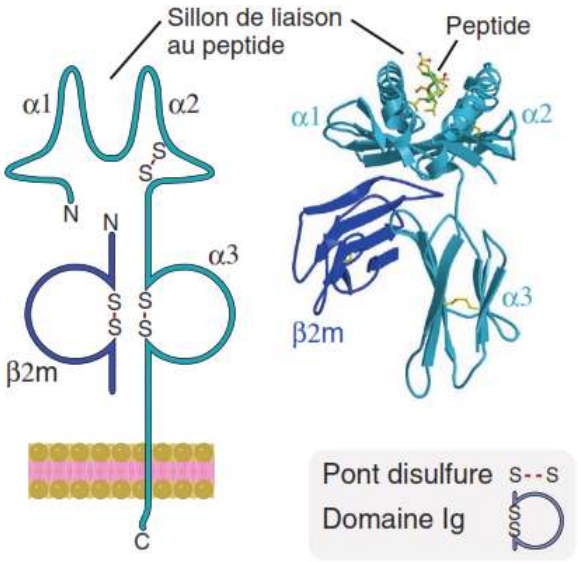


Figure 10 : structure des récepteurs du CMH de classe I [81]

Les molécules du CMH de classe I sont exprimées par la quasi-totalité des cellules nucléées. Leur fonction première est la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD8.

1-4-1.2. Les protéines du CMH de classe II

Chaque molécule du CMH de classe II est composée de deux chaines dénommées α et β. Chaque chaine possède deux domaines.

Les domaines amino-terminaux de ces deux chaines nommées α1 et β1 forment un large sillon pouvant reconnaitre des peptides antigéniques de dix à trente acides aminés. Ces deux domaines sont le siège d'une grande variabilité interpersonnelle.

Les domaines α2 et β2 sont constants et contiennent le site de liaison au corécepteur CD4 des lymphocytes T.

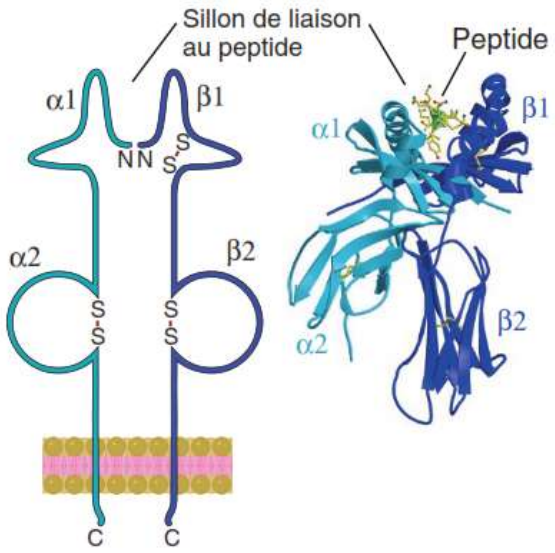


Figure 11 : structure des récepteurs du CMH de classe II [81]

Les molécules du CMH de classe II ne sont exprimées que par les cellules présentatrices d'antigène. Leur fonction première est la présentation des déterminants antigéniques aux lymphocytes T CD4. En plus de leur fonction dans la présentation antigénique, les molécules du CMH de classe II jouent un rôle important dans la susceptibilité aux maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, le diabète de type I et la sclérose en plaques [4].

1-4-1.3. Apprêtement et présentation des antigènes

Il existe une certaine ségrégation dans les voies d'apprêtement des antigènes selon la classe de CMH devant réaliser la présentation aux lymphocytes T. Ainsi, les protéines dans le cytosol de toute cellule nucléée sont apprêtées dans des complexes protéolytiques appelés protéasomes. Elles sont ensuite présentées par des molécules du CMH de classe I. Tandis que les protéines extracellulaires qui sont internalisées par les CPA dans des vésicules d'endocytose sont apprêtées dans les endosomes tardifs et les lysosomes et présentées par des molécules du CMH de classe II. La ségrégation des voies d'apprêtement des antigènes assure que différentes classes de lymphocytes T reconnaissent les antigènes provenant de différents compartiments cellulaires.

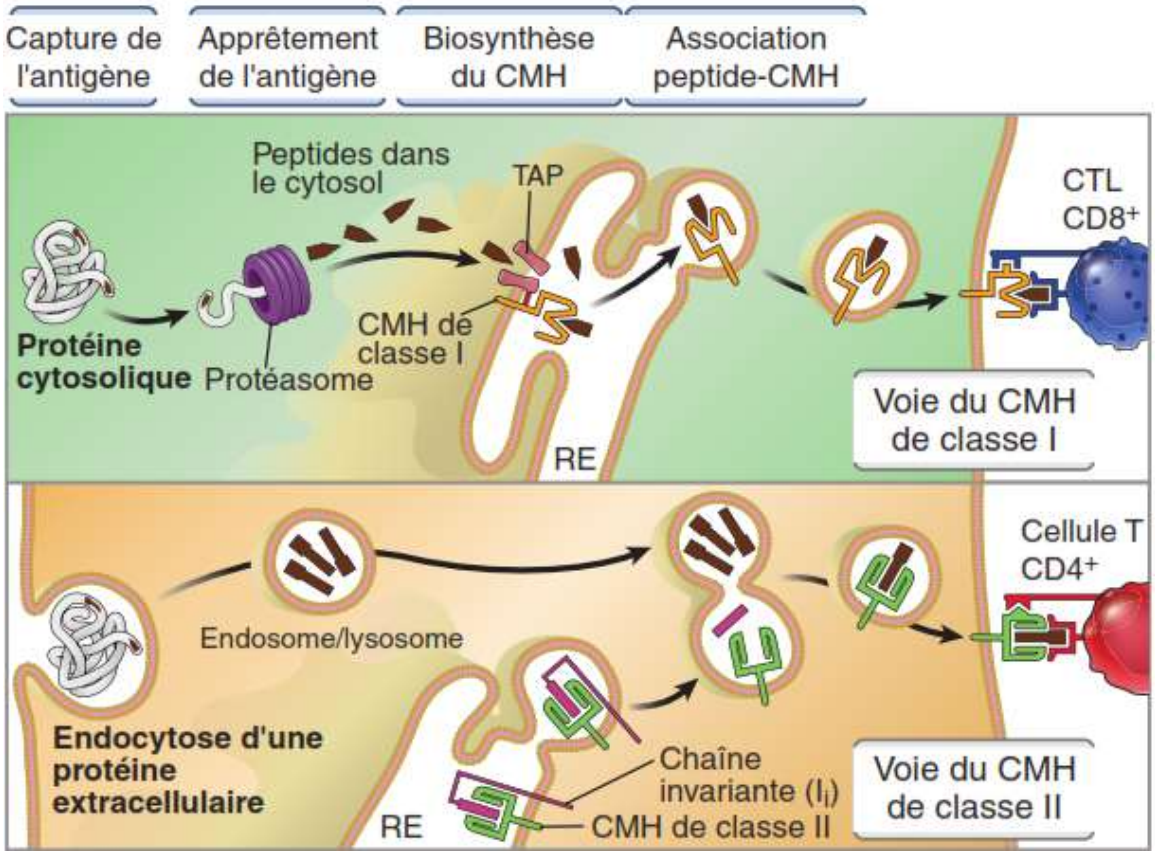


Figure 12 : voies d'apprêtement des peptides antigéniques [81]

1-4-2. Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité

Ils sont situés sur le chromosome 6.

- **Les loci de classe I**

Il existe trois loci classiques de classe I dénommés HLA- A, HLA- B et HLA-C. Ce sont les loci principaux. Chez l'homme, chaque personne reçoit l'ensemble des gènes correspondant à ces loci de chacun de ses deux parents. Chaque cellule peut exprimer six molécules de classe I différentes. Par ailleurs, il existe trois loci non classiques nommés HLA- E, HLA-F et HLA-G. Ils diffèrent des précédents par leur polymorphisme limité, leur distribution tissulaire, leur expression génétique restreinte et leur rôle moindre en médecine de transplantation.

- **Les loci de classe II**

Il existe trois principales sous-régions de classe II : HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR. Chaque sous-région porte des loci A et B codant respectivement pour une chaine α et β. Ces gènes possèdent un nombre variable d'allèles.

Parmi les loci de classe I le locus HLA-B est celui présentant le plus grand nombre d'allèles. Parmi ceux de classe II, HLA-DRB est le locus présentant la plus grande variabilité.

Tableau IV : nombre d'allèles répertoriés pour les principaux loci du système HLA [82]

	Nombre d'allèles
HLA- A	965
HLA-B	1543
HLA-C	626
HLA-DPA	28
HLA-DPB	138
HLA-DQA	35
HLA-DQB	107
HLA-DRA	3
HLA-DRB	855

1-4-3. Polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité et association avec le virus de l'hépatite B

L'avènement des nouvelles technologies de génotypage nous donne la possibilité de détecter quasiment toutes les différences dans le génome des individus. Le prochain challenge est de corréler ces différences génétiques à des situations pathologiques et à la réponse à la thérapie [14]. Les différences interindividuelles dans les gènes du CMH sont à l'origine de protéines avec des séquences d'acides aminés différentes et par ricochet des capacités de liaison aux peptides antigéniques toutes aussi variables. Les variations génétiques les plus récemment mises en exergue sont celles issues de changements mononucléotidiques.

L'association des polymorphismes mononucléotidiques (SNP) du HLA au virus de l'hépatite B a été évaluée à travers plusieurs études. Ces travaux partaient du constat de différences statistiquement significatives dans les fréquences des allèles de certains SNP d'une région géographique à l'autre. Et ces variations de fréquences étaient superposables aux données épidémiologiques du VHB. Certains allèles étaient significativement plus présents dans les zones à forte endémicité au VHB.

En Afrique, quatre SNP ont montré une variation significative ($p \leq 0.00001$) de leurs fréquences alléliques. Il s'agit des gènes rs2856718, rs9275572, rs3077 et rs92773 [5]. Certains de ces polymorphismes ont été étudiés afin de démontrer leur implication dans les hépatopathies liées au VHB. C'est le cas du gène rs3077.

Les deux allèles de ce gène diffèrent l'un de l'autre par un simple remplacement de l'adénine (A) par la guanine (G) sur l'un des brins de la double hélice d'ADN. Ce remplacement se produit dans la séquence 3' non traduite du locus HLA-DPA1 [83]. Avec la complémentarité des bases, l'adénine (A) et la guanine (G) sont respectivement toujours liées à la thymine (T) et la cytosine (C)

sur le brin complémentaire. Le remplacement de A par G sur un brin correspond donc à une substitution de T par C sur le brin complémentaire.

Les régions 3'non traduites contiennent des sites de fixation à des protéines de régulation de la traduction ainsi qu'à des micro-ARN. Ces derniers sont susceptibles de diminuer l'expression des gènes en inhibant leur traduction ou en dégradant directement leur transcrit. Ainsi donc, bien qu'une mutation survienne sur une région non transcrite, elle peut être à l'origine de modifications transcriptionnelles et par ricochet de différences fonctionnelles.

Les études réalisées sur le gène rs3077 témoignent du rôle protecteur de l'allèle A (ou T s'il s'agit du brin complémentaire) allant même jusqu'à le décrire comme « un déterminant majeur de la clairance du VHB » [9,10,11].

1-4-4. Particularité des études d'association génomique [85]

L'association d'un gène à une situation pathologique donnée présente certaines particularités qu'il convient de souligner. Elle est généralement évaluée en faisant recours à des enquêtes étiologiques (étude prospective de cohorte, étude cas-témoins). L'effet des allèles d'un gène peut varier en fonction de leur mode d'hérédité (dominance d'un allèle par rapport à un autre qui est récessif ou codominance). Ainsi, afin d'associer un gène à une situation pathologique, il est intéressant de regrouper les données de manière à refléter un modèle biologique d'effet génique. Plusieurs possibilités s'offrent donc au chercheur. Prenons l'exemple d'un gène quelconque possédant deux allèles nommés A et a, et dont on veut vérifier l'association avec une maladie via une étude cas-témoins. Les génotypes possibles sont AA, Aa et aa. L'évaluation du lien entre ce gène et la maladie peut se faire :

- en comparant directement les fréquences des allèles A et a entre les groupes cas et témoin ;

- en assumant un modèle génétique de transmission (dominant : AA+Aa versus aa ; récessif : AA versus Aa +aa ; codominant : AA versus Aa versus aa) ;
- en réalisant plusieurs comparaisons par paire (par exemple AA versus aa, AA versus Aa, …) ;
- en combinant plusieurs des méthodes suscitées au prix de multiples comparaisons.

2- Cadre et méthodes d’étude

2-1- Cadre d'étude

Notre étude s'est essentiellement déroulée à Cotonou, capitale économique de la République du Bénin. C'est la plus grande ville du pays avec une superficie de 79 km², et 143 quartiers regroupés en 13 arrondissements.

Notre étude a eu conjointement pour cadre :

- La Clinique Universitaire d'Hépato-Gastro-Entérologie du Centre Hospitalier Universitaire Hubert Koutoukou Maga (CNHU-HKM)
- L'antenne départementale Atlantique-Littoral de l'Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine (ANTS) située au CNHU-HKM.
- Le laboratoire de cytogénétique et de biologie moléculaire (Unité de Biologie Humaine) de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou.
- L'Institut de Microbiologie, d'Immunologie et de Parasitologie de la Clinique Universitaire de Bonn en Allemagne.

2-1-1. La Clinique Universitaire d'Hépato-Gastro-Entérologie du CNHU-HKM

Notre étude s'est déroulée avant la fusion-absorption de l'Hôpital d'instruction des armées (HIA) avec le CNHU HKM. Le service était alors divisé en deux blocs :

- Un bloc d'hospitalisation situé dans l'aile B du bâtiment des « Hospitalisations Médecine »
- Un bloc de consultation et d'explorations digestives qui se trouvait en face de la salle d'accouchement du service de Gynécologie-Obstétrique

Ce service a été un des sites de recrutement des sujets de notre étude.

2-1-2. L'antenne départementale Atlantique-Littoral de l'ANTS

L'Agence Nationale de Transfusion Sanguine est organisée en trois niveaux (central, intermédiaire et périphérique)

- Niveau central

  Il comprend :

  - ✓ la Direction de la Prospective et de la Recherche ;
  - ✓ la Direction de l'Administration, des Finances et du Matériel ;
  - ✓ la Direction de la Production ;
  - ✓ la Direction de la Communication et de la Promotion du Don de Sang ;
  - ✓ la Cellule Assurance Qualité et Hémovigilance ;
  - ✓ le Centre de Formation Professionnelle en Transfusion Sanguine.

Ces directions techniques assurent l'encadrement des activités au niveau intermédiaire.

- Niveau intermédiaire

Il est composé de cinq antennes départementales (AD-ANTS) encadrant les activités de transfusion sanguine dans leurs départements respectifs. Il s'agit de :

- ✓ l'AD-ANTS Atacora-Donga à Natitingou ;
- ✓ l'AD-ANTS Atlantique-Littoral à Cotonou ;
- ✓ l'AD-ANTS Borgou-Alibori à Parakou ;
- ✓ l'AD-ANTS Ouémé-Plateau à Porto-Novo ;
- ✓ l'AD-ANTS Zou-Collines à Abomey.

- Niveau périphérique

Il est constitué de trente-quatre postes de transfusion sanguine qui sont intégrés au Laboratoire d'Analyses Biomédicales des Hôpitaux de Zone et qui contribuent à la production et à la distribution des produits sanguins labiles.

L'antenne départementale Atlantique-Littoral de l'ANTS a servi de site de recrutement pour les sujets de notre étude. Elle est située dans l'enceinte du CNHU-HKM et partage le même bâtiment que la Banque de Sang (BDS). Elle se charge de la collecte de sang au poste fixe situé en son sein et au niveau de divers postes mobiles au travers de campagnes de collecte de sang organisées dans les deux départements. L'antenne stocke et réalise la qualification des poches de sang avant leur distribution.

L'entretien avec les sujets inclus dans l'étude a été réalisé à l'accueil, dans le hall conjoint de l'AD-ANTS Atlantique-Littoral et de la BDS. Les échantillons sanguins des participants ont été recueillis en salle de prélèvement.

2-1-3. Le laboratoire de cytogénétique et de biologie moléculaire (Unité de Biologie Humaine) de la FSS

Il est situé dans la faculté des sciences de la santé de Cotonou, plus précisément dans l'enceinte de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA). Le laboratoire est constitué de plusieurs salles dédiées à des applications diverses :

- une salle contenant des centrifugeuses et des hottes où sont réalisées les extractions d'ADN et la préparation des milieux de culture.
- une salle de microscopie conventionnelle
- une salle de Cytogénétique moléculaire
- une salle polyvalente

C'est dans ce laboratoire qu'ont été réalisés, recueil de plasma sur échantillons sanguins, extractions d'ADN et génotypage.

2-1-4. L'Institut de microbiologie, d'immunologie et de parasitologie de la clinique universitaire de Bonn

Il est situé dans la ville de Bonn, ville fédérale de l'ouest de l'Allemagne et possède plusieurs pôles fonctionnels. Les tests immunologiques de dosage de cytokine ont été réalisés au sein du laboratoire d'immunologie humaine de l'institut.

2-2- Méthode d'étude

2-2-1. Type d'étude

Il s'est agi d'une étude transversale cas-témoins avec :

- une description des paramètres socio-démographiques et cliniques concernant les données cliniques et biologiques des sujets du groupe cas
- une partie analytique concernant le dosage des cytokines et le génotypage

2-2-2. Période d'étude

Notre travail de recherche s'est déroulé sur une période de 4 mois allant du 5 septembre 2022 au 5 janvier 2023.

2-2-3. Population d'étude

Les sujets du groupe cas ont été choisis parmi les patients suivis au sein du service d'hépato-gastro-entérologie du CNHU-HKM.

A ceux-ci, nous avons apparié selon l'âge et le sexe des sujets témoins choisis parmi des donneurs réguliers de sang à l'antenne Atlantique-Littoral de l'ANTS.

2-2-3.1. Critères d'inclusion

Ont été inclus dans le groupe cas, des sujets :

- mélanodermes,
- porteurs chroniques du VHB (persistance de l'Ag HBs au-delà de 6 mois),

- suivis en consultation et en hospitalisation à la Clinique Universitaire d'Hépato-Gastro-Entérologie du CNHU-HKM.

Les sujets du groupe témoin ont été choisis en appariant selon l'âge et le sexe des sujets du groupe cas :

- des mélanodermes,
- donneurs réguliers du site de collecte fixe de l'AD-ANTS Atlantique-Littoral (Sis au CNHU-HKM)),
- testés deux fois négatifs à l'AgHBs au cours de l'année 2022 lors des contrôles de validation,
- dont le dernier test remonte à moins de 6 mois.

2-2-3.2. Critères de non-inclusion

Nous n'avons pas inclus dans le groupe cas, les sujets dont la détection de l'AgHBs a été réalisée à l'aide de tests de diagnostic rapide. Seuls les tests réalisés sur chaine ELISA ont été pris en compte.

Dans les deux groupes, les sujets n'ayant pas donné leur consentement écrit après l'entretien n'ont pas été pris en compte.

2-2-4. Echantillonnage

Nous avons procédé à un échantillonnage aléatoire simple des sujets répondant aux critères d'inclusion tout en appliquant strictement les critères de non-inclusion sus décrits.

Le calcul de la taille d'échantillon optimale pour chaque groupe nécessiterait de connaitre les chiffres approximatifs de fréquences des allèles du gène rs3077 chez les sujets porteurs chroniques du virus de l'hépatite B et chez ceux testés négatifs [86]. Par ailleurs, le gène subit des différences de fréquence extrêmes d'une zone géographique à une autre. Ainsi les fréquences globales mondiales ne peuvent être appliquées à une population aussi restreinte que celle-

ci au sud du Bénin. Qui plus est, les travaux similaires réalisés dans d'autres populations étaient pour la plupart des études d'association génomique à grande échelle où les tailles d'échantillons étaient définies de manière arbitraire. Les chercheurs avaient procédé au recrutement exhaustif de tous les sujets porteurs chroniques du VHB disponibles sur le site et dans la période d'étude.

En ce qui nous concerne, les données spécifiques n'étant pas disponibles, nous avons déterminé une taille d'échantillon représentative du groupe cas en utilisant la formule de Schwartz comme suit :

$$n = \frac{pq\varepsilon^2}{i^2}$$

p : prévalence de l'hépatite B en population béninoise = 0,06 [11]

$q = 1 - p$ =0,94

ε : Ecart réduit pour un risque α 5% =1,96

i : Précision 7%

n : sensiblement égal à 45

Il nous fallait donc au moins 45 sujets pour avoir un échantillon représentatif de porteurs chroniques du VHB.

Nous avons procédé dans un premier temps au recrutement de 48 sujets porteurs chroniques du VHB pour le compte du groupe cas. Puis nous avons recruté 49 sujets pour le compte du groupe témoin. Cela portait la taille totale de notre échantillon à 97 sujets.

2-2-5. Variables

La variable dépendante de notre étude a été le portage chronique du virus de l'hépatite B.

Les variables indépendantes étaient : l'âge, le sexe, l'ethnie, la consommation d'alcool, la consommation de substances hépatotoxiques (alcool, tisane,…), les autres pathologies chroniques, les co-infections, le niveau de

fibrose hépatique, le carcinome hépatocellulaire, le stade de lh'istoire naturelle de l'infection, le génotype rs307 et la concentration des 21 cytokines dosées.

2-2-6. Aspects opérationnels des variables

- **Âge**

C'est une variable quantitative discrète exprimée en année.

- **Sexe**

Il a été considéré dans notre étude comme une variable qualitative binaire. Les deux modalités possibles étant : masculin et féminin.

- **Ethnie**

Il s'agit d'une variable qualitative nominale qui a été opérationnalisée en utilisant la classification faite par le quatrième recensement général des populations et de l'habitation au Bénin. Les modalités possibles sont donc : Yoruba et apparentés ; Fon et apparentés ; Adja et apparentés ; Yoa/Lokpa et apparentés ; Peulh et apparentés ; Gua/Otamari et apparentés ; Dindi et apparentés ; Autres.

- **Consommation d'alcool**

Il s'agit d'une variable quantitative continue. Elle a été évaluée en gramme d'alcool consommé par mois.

La quantité en gramme d'alcool consommée par boisson a été déterminée par la formule suivante :

$$Quantité\ d'alcool = volume\ consommé\ (dl) \times degré\ de\ la\ boisson \times 0{,}8$$

0,8 correspond à la densité de l'alcool

- **Autres potentiels hépatotoxiques**

Variable qualitative nominale, elle regroupe toutes les substances potentiellement toxiques pour le foie (Surdosage en médicaments, tisanes, …) autres que l'alcool consommées par le sujet enquêté.

- **Autres pathologies chroniques**

C'est une variable qualitative nominale désignant les maladies chroniques présentées par le sujet enquêté (diabète, hypertension artérielle, insuffisance rénale chronique, …).

- **Co-infections (VIH, VHC, VHD)**

Ce sont des variables qualitatives nominales. Les modalités possibles sont : présent ; absent ; non disponible (sérologie non faite).

Les sérologies virales ont été obtenues en consultant le dossier du patient.

- **Évaluation non invasive de la fibrose hépatique**

Au cours de notre étude, nous avons évalué le degré de fibrose, variable qualitative ordinale, par le fibroscan et/ou le score APRI de la manière suivante :

- ✓ La fibrose a été jugée « Non significative » pour un score APRI inférieur à 0,5 et/ou une élasticité hépatique inférieure ou égale à 8,1kpa. Cette classe englobe donc les valeurs d'élasticité hépatique correspondant à une absence de fibrose et à une fibrose minime.
- ✓ La fibrose a été jugée « significative » pour un score APRI compris entre 1,5 et 2 et/ou une élasticité hépatique allant de 8,2kpa à 14,5kpa. Ainsi, les mesures d'élasticité hépatique correspondant à une fibrose modérée et à une fibrose sévère ont toutes été englobées dans cette catégorie.
- ✓ Nous avons classé au stade de « cirrhose » les patients ayant un score APRI et/ou une élasticité hépatique respectivement supérieurs à 2 et/ou 14,5 kpa. Par ailleurs les signes cliniques et paracliniques de dysmorphie

hépatique, d'hypertension portale et d'insuffisance hépatocellulaire venaient renforcer le diagnostic de cirrhose.

Tout sujet chez qui on ne disposait ni du fibroscan ni des examens biologiques nécessaires au calcul du score APRI a été systématiquement classé « Indéterminé ».

- **Carcinome hépatocellulaire**

Il a été diagnostiqué sur la base d'un critère biologique (élévation de l'alpha fœto-protéine) associé à une hépatomégalie douloureuse ou à au moins un des critères morphologiques suivants :

- ✓ thrombose porte à l'échographie,
- ✓ Lésion hépatique spontanément hypodense hypervascularisée au temps artériel après injection de produit de contraste (« Wash in »), avec une chute de contraste au temps portal (« wash-out ») à la TDM ou à l'IRM.

Tous les patients chez qui les données cliniques et paracliniques étaient insuffisantes pour conclure ont été systématiquement classés « Indéterminé ».

- **Stade de l'histoire naturelle**

Il s'agit d'une variable qualitative nominale dont les modalités sont :

- ✓ infection chronique antigène HBe-,
- ✓ infection chronique antigène HBe+,
- ✓ hépatite chronique Antigène HBe-,
- ✓ hépatite chronique Antigène HBe+,

- ✓ infection occulte,
- ✓ indéterminé.

- **Génotype rs3077**

C'est une variable qualitative à 3 modalités :

- ✓ Homozygote C (CC)
- ✓ Hétérozygote (CT)
- ✓ Homozygote T (TT)

- **Concentrations des 21 cytokines dosées**

Ces 21 cytokines sont : G-CSF, GM-CSF, IFN α, IFN ɣ, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p70, IL 13, IL-17A, IL-18, IP-10, MCP-1, MIP-1 alpha, MIP-1 bêta, TNF α, TNF β

Les concentrations de cytokine sont des variables quantitatives continues exprimées en picogramme par millilitre (pg/ml).

2-2-7. Déroulement de l'étude

2-2-7.1. Le recrutement des sujets du groupe cas

Sur une période de six semaines, nous avons recruté 48 sujets pour le compte du groupe cas dont 5 en hospitalisation et 43 en consultation. Nous avons eu un entretien avec chacun des participants afin de recueillir leur consentement écrit. Un numéro d'identification a été attribué à chaque sujet pour conserver l'anonymat.

À l'aide d'une fiche de collecte préétablie (confère annexe 1) nous avons recueilli les renseignements généraux, les facteurs de risque de maladie hépatique présentés ainsi que les données paracliniques.

Au terme du remplissage de cette fiche, nous avons procédé au prélèvement d'au moins 5 millilitres de sang périphérique dans un tube contenant de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) et étiqueté en utilisant le numéro d'identification attribué au patient. Les prélèvements ont été réalisés dans le strict respect des règles d'asepsie à l'aide d'aiguilles stériles à usage unique montées sur corps vacutainer.

2-2-7.2. Le recrutement des sujets du groupe témoin

Il a été réalisé sur une période de deux semaines à la suite du recrutement du groupe cas. Les sujets répondant aux critères d'inclusion ont été pris en entrevue afin de leur expliquer notre travail de recherche et d'obtenir leur consentement écrit. Un numéro d'identification était par la suite attribué aux participants ayant donné leur accord.

Puisqu'il s'agissait de sujets venus pour faire un don de sang, le prélèvement était réalisé directement au cours du don dans un tube EDTA.

2-2-7.3. Acheminement des prélèvements au laboratoire de cytogénétique et de biologie moléculaire (Unité de Biologie Humaine) de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou

Les prélèvements étaient convoyés de façon journalière au laboratoire et conservés à 4 °C s'ils ne pouvaient être traités le même jour.

2-2-7.4. Centrifugation des échantillons du groupe cas

Les échantillons des sujets du groupe cas ont été centrifugés dès leur arrivée au laboratoire de cytogénétique à 1200 tours par minute pendant dix minutes afin de séparer le culot cellulaire du plasma.

Six-cents microlitres de plasma ont été prélevés et conditionnés dans des cryotubes à -20°C afin de servir plus tard au dosage des cytokines.

Le contenu restant du tube EDTA était stocké à 4°C pour l'extraction d'ADN.

2-2-7.5. Extraction d'ADN par méthode phénol chloroforme

De l'ADN a été extrait à partir de 500 à 750 microlitres de sang des sujets des deux groupes par la méthode phénol-chloroforme encore appelée méthode organique.

Développée en 1987 par Piotr Chomczynski et Nicoletta Sacchi, cette méthode est basée sur la différence de solubilité des acides nucléiques dans une émulsion à deux phases (une phase protéique et une phase aqueuse) [87].

Les différentes étapes suivies pour la réalisation de l'extraction d'ADN sont notifiées en annexe 9.

2-2-7.6. Recherche des allèles du gène rs3077

Elle a été réalisée en amplifiant la séquence d'intérêt par réaction de polymérisation en chaine (PCR). La discrimination allélique a été faite par réaction 5' nucléase.

- **Principe**

Le principe de la PCR est de reproduire in vitro la réplication de l'ADN à l'aide d'un thermocycleur. On réalise un mélange réactionnel avec l'ADN à tester, une polymérase synthétique, des nucléotides et des courtes séquences d'amorces sens et anti-sens spécifiques à la région génétique d'intérêt. Le thermocycleur dénature l'ADN en le portant à forte température puis les amorces s'hybrident à leur séquence complémentaire sur l'ADN à tester. La polymérase incorpore ensuite des nucléotides pour allonger l'amorce précédemment hybridée [88]. Ce cycle est répété plusieurs fois afin d'accroitre de manière exponentielle la séquence cible dans le mélange réactionnel.

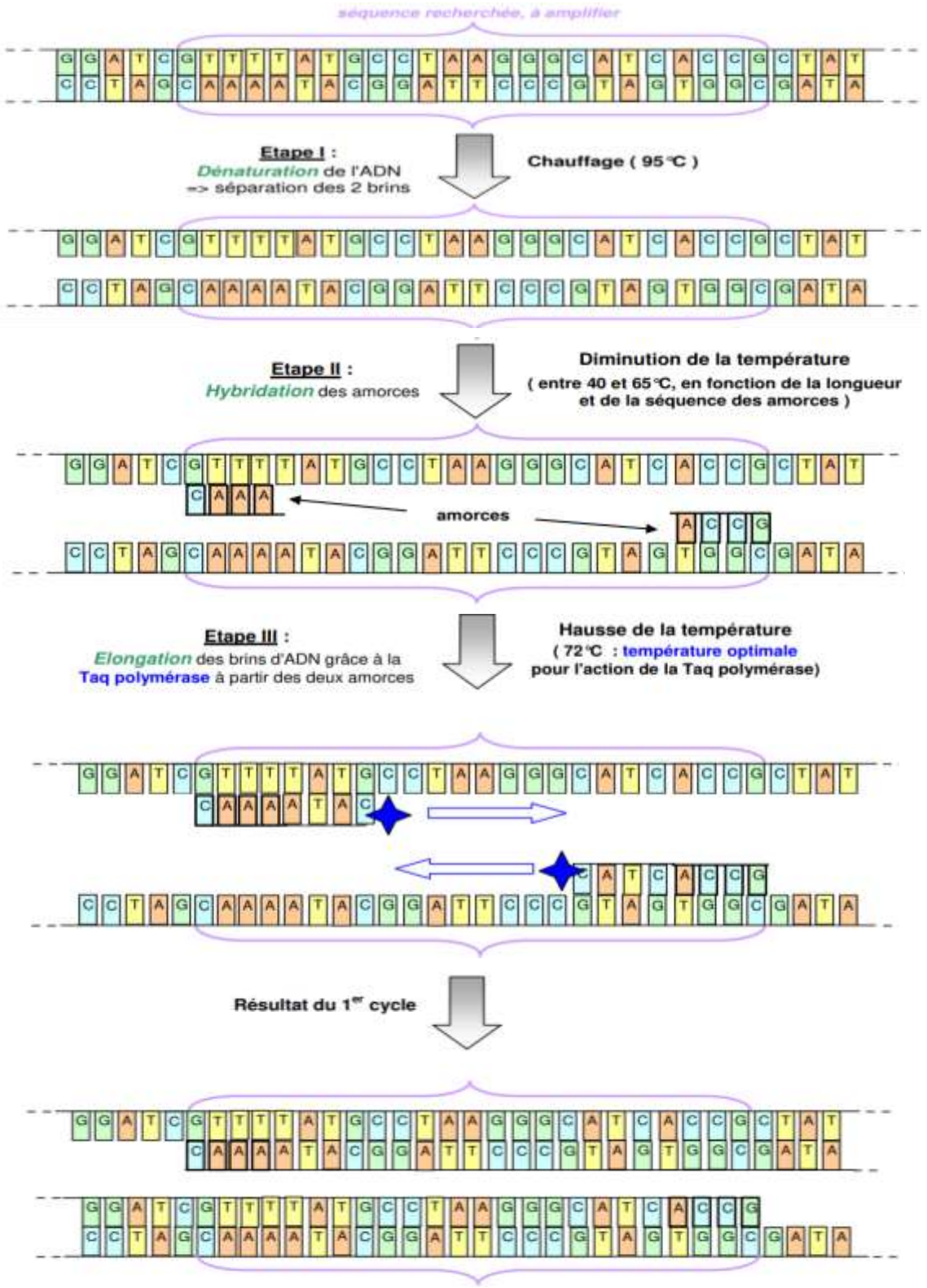
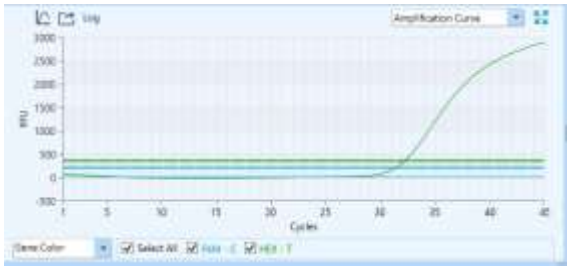


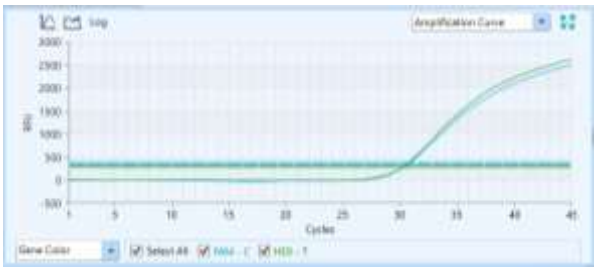
Figure 13 : principe de l'amplification génétique par PCR [88]

La discrimination allélique par réaction 5' exonucléase encore appelée méthode Taqman® est une forme de PCR qui en plus des amorces précédemment évoquées fait recours à des sondes s'hybridant spécifiquement à chaque allèle. Ces sondes sont de courtes séquences nucléotidiques possédant à leur extrémité 5' un fluorophore et à celle 3' un inhibiteur. Durant l'étape d'élongation, le fluorophore se dissocie de la sonde suite à l'activité 5'-3' exonucléasique de la polymérase, permettant dès lors l'émission de fluorescence [85,86]. Cette fluorescence est détectée par le thermocycleur s'il dispose de capteurs adéquats.

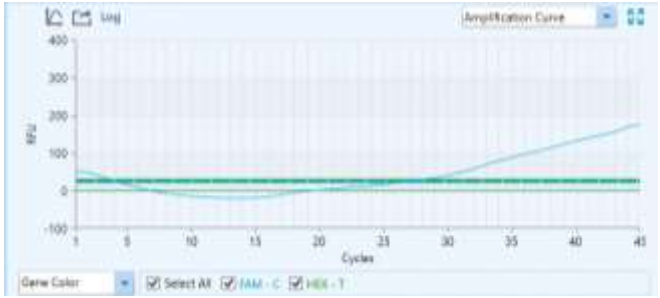
Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé des amorces sens et anti-sens ainsi que deux sondes de fluorescence spécifiques à chacun des allèles T et C avec respectivement comme fluorophore l'hexachloro-fluorescéine (HEX) et l'amidite de fluorescéine (FAM). Les références de chacun des réactifs utilisés sont disponibles en annexe. Chaque sonde étant spécifique à un allèle, on a déduit grâce au nombre et au type de signal, le génotype de l'individu.



A



B



C

Figure 14 : courbes d'amplification

La courbe A est celle d'un sujet homozygote T (seul le signal HEX est présent). La courbe B est celle d'un hétérozygote (les deux signaux, HEX et FAM sont présents). La courbe C est celle d'un sujet homozygote C (le signal FAM est le seul émis).

- **Préparation du mélange de génotypage pour rs3077**

Les différents réactifs nous sont parvenus lyophilisés. Ils ont été remis en solution avec un tampon T10E0,1 pour obtenir des concentrations stock de 100µM. Les concentrations finales dans le mélange étaient de 14 µM pour les amorces et de 2 µM pour les sondes alléliques. Ainsi, pour réaliser 50 µl de mélange de génotypage en partant de réactifs en concentration stock de 100 µM, nous avons utilisé :

- ✓ 7 µl de chaque amorce.
- ✓ 2 µl de chaque sonde allélique
- ✓ 34 µl de tampon T10E0,1

- **Réalisation du test**

Les tests de génotypage ont été réalisés sur la plateforme de PCR en temps réel Gentier 48E de la firme TIANLONG©. Ce thermocycleur permet de lancer simultanément le test dans 48 puits et détecte à la fin de chaque cycle d'amplification les fluorescences émises via des photodiodes.

Le mélange réactionnel pour chaque échantillon à analyser a été concocté dans des tubes pour PCR. Les réactions ont été réalisées pour un volume total de 10µl répartis comme suit :

- ✓ Mastermix Taqman® (Polymérase + nucléotides) : 5 µl
- ✓ Mix de génotypage (amorces + sondes alléliques) : 0,5 µl
- ✓ Eau sans nucléase : 2 µl

- ✓ ADN à tester (concentré entre 5 et 25 ng/µl) : 2,5 µl

Notons que dans un des tubes PCR, 2,5 µl d'eau sans nucléase ont été mis en lieu et place de l'ADN pour servir de contrôle négatif. Les tubes apprêtés ont été recouverts et posés dans les puits du thermocycleur.

Le programme d'amplification suivant a été utilisé :

- ✓ 2 minutes à 50°C
- ✓ 10 minutes à 92°C
- ✓ 45 cycles de 2 minutes (soit 30 secondes à 95 °C et 1 minute 30 secondes à 60 °C).

Les courbes d'amplification ont été analysées en temps réel et en fin de réaction.

2-2-7.7. Dosage de cytokines par la technique luminex® Xmap

- **Principe du test**

La technique Luminex® Xmap est un type de dosage immunologique qui mesure avec précision plusieurs analytes dans un échantillon. C'est un immuno-essai à base de billes capables de détecter simultanément jusqu'à 100 analytes multiplexés. Les billes sont colorées en interne avec des rapports variables de fluorophores rouges et infrarouges correspondants à des signatures spectrales ou à des régions de billes spécifiques. Un anticorps spécifique de l'analyte d'intérêt est lié à une seule région de billes et incubé avec l'échantillon. Après avoir retiré le matériel non lié, les échantillons sont incubés avec un mélange d'anticorps de détection biotinylé et de rapporteur streptavidine-phycoérythrine (PE). Un instrument Luminex est utilisé pour exciter les billes via un laser et déterminer à leur surface, les analytes associés correspondants. Un autre laser détermine l'amplitude du signal dérivé du PE, qui est proportionnelle à la quantité d'analytes liés [91]. Pour connaitre la concentration exacte de l'analyte, l'amplitude obtenue

est comparée aux signaux de référence pour des concentrations connues de ce même analyte. Plusieurs mesures sont effectuées sur chaque région de bille pour assurer une détection robuste.

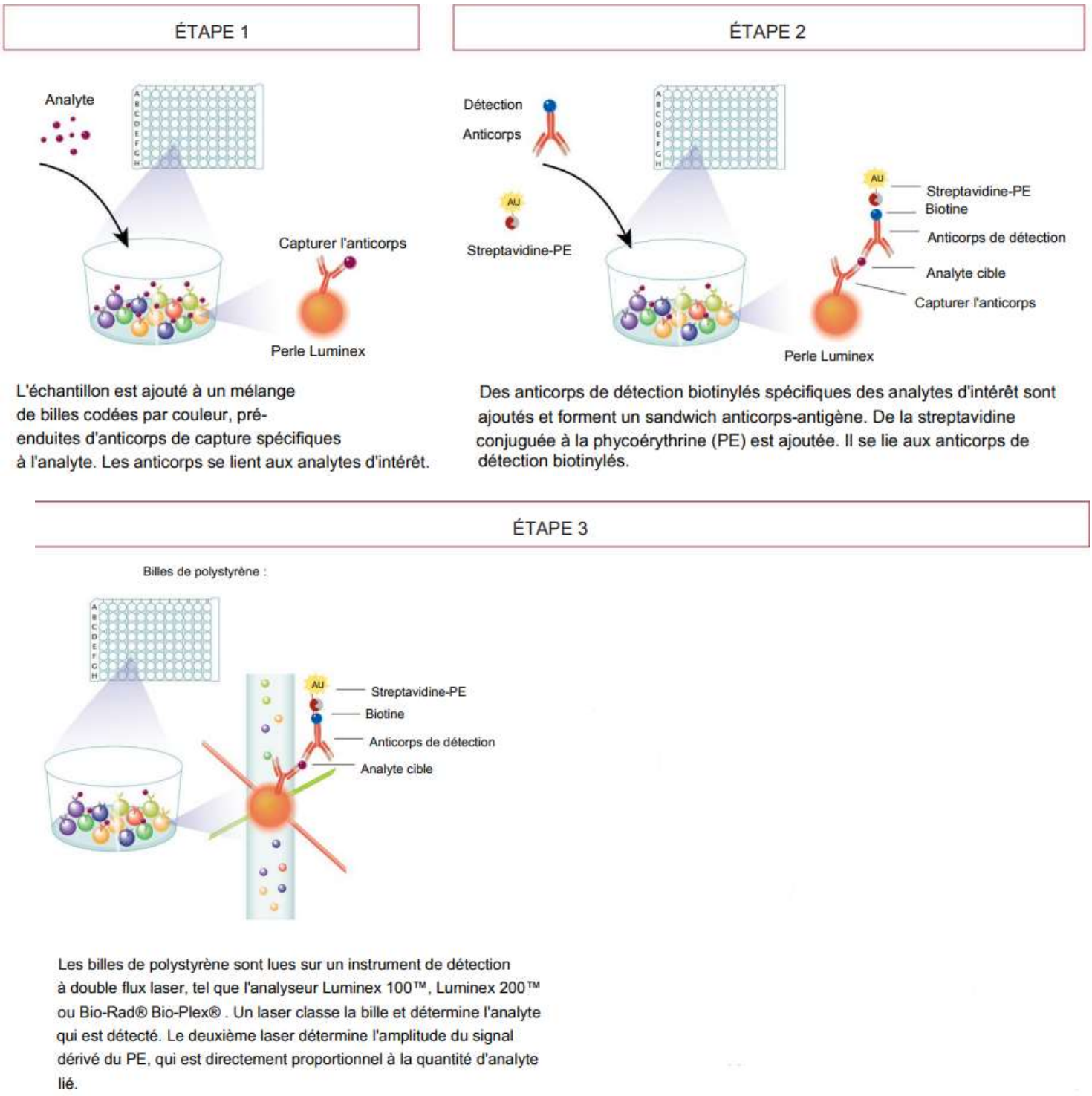


Figure 15 : principe de la technique de dosage Luminex®Xmap [91]

Dans le cadre de notre étude, les tests ont été réalisés avec le ‘‘kit Cytokine Storm 21-Plex Human ProcartaPlex™ Panel’’ de la firme Invitrogen™ (références en annexe). Ce kit permet l'analyse de 21 cytokines : G-CSF, GM-CSF, IFN α, IFN ɣ, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p70, IL 13, IL-17A, IL-18, IP-10, MCP-1, MIP-1 α, MIP-1 β, TNF α, TNF β. Il contient deux flacons de mélange standard humain A (lyophilisé) ; deux flacons de mélange standard humain B (lyophilisé) ; deux flacons de mélange standard humain E (lyophilisé) ; un flacon de mélange de billes de capture; un flacon de mélange d'anticorps de détection biotinylés ; un flacon de tampon de lecture ; un flacon de tampon de lavage ; un flacon de streptavidine-PE ; un flacon de tampon de dosage universel ; une barrette de 8 tubes ; du film adhésif et une plaque à 96 puits à fond plat.

Ce dosage a été réalisé sur 28 sujets du groupe cas.

- **Préparation des échantillons et des réactifs**

Les échantillons de plasma précédemment récupérés après centrifugation du sang total et conservés à -20°C ont été dégivrés. Ils ont été à nouveau centrifugés à 10000 tours par minute pendant 10 minutes afin d'éliminer complètement les plaquettes qui auraient pu s'y retrouver malgré la première centrifugation.

Ensuite, le tampon de lavage, le mélange standard et ses sept dilutions servant d'étalons, ont été préparés conformément aux instructions du constructeur du kit (confère annexe).

- **Déroulement du dosage**

Le dosage proprement dit s'est globalement déroulé comme suit :

- ✓ Dans un premier temps, 50µl de solution de billes de capture ont été mis dans chaque puit de la plaque.

- ✓ Les billes ont été lavées avec 150 µl de tampon de lavage par puit à l'aide d'un laveur de plaque magnétique. Le tampon de lavage a été éliminé de la plaque après 30 secondes.
- ✓ 25µl du tampon de dosage universel ont été ajoutés dans tous les puits.
- ✓ 25 µl de plasma ont été ajoutés pour les 28 puits réservés aux échantillons à tester.
- ✓ 14 puits ont été remplis avec 25 µl des 7 dilutions de la solution étalon (à raison de 2 puits pour chaque dilution). Cette duplication des étalons a permis d'avoir des mesures plus précises.
- ✓ 2 puits ont été remplis avec 25µl de tampon de lavage pour servir de contrôle négatif.
- ✓ La plaque a été scellée et posée sur un agitateur à température ambiante pendant 2 heures.
- ✓ Trois lavages ont ensuite été réalisés.
- ✓ Le mélange de tampon d'anticorps a été ensuite mis dans tous les puits à raison de 25µl.
- ✓ La plaque a de nouveau été scellée, déposée sur l'agitateur à température ambiante pendant 30 minutes suivies de trois lavages successifs.
- ✓ L'on a ajouté 50µl de streptavidine-PE et scellé la plaque pour la poser sur l'agitateur pendant 30 minutes puis réalisé 3 lavages supplémentaires.
- ✓ Les billes ont été resuspendues au sein des puits avec 120µl de tampon de lecture et la plaque, de nouveau scellée et posée sur l'agitateur pendant 5 minutes.

Au terme de cette préparation, la plaque a été analysée à l'aide de l'outil Luminex MAGPIX™. Les données d'analyses ont été exportées de

l'instrument en format « .csv ». Les données exportées ont été analysées avec l'application « ProcartaPlex™ analyst » de la firme Thermofisher©. Ce logiciel a permis de déterminer des courbes de concentration standard en fonction de l'amplitude de signal émis par les solutions étalon. Les courbes ont été réajustées en utilisant un algorithme 4PL. L'équation régissant ces courbes a ensuite été utilisée par le logiciel pour calculer les concentrations des analytes des échantillons testés en fonction des amplitudes de fluorescence émises.

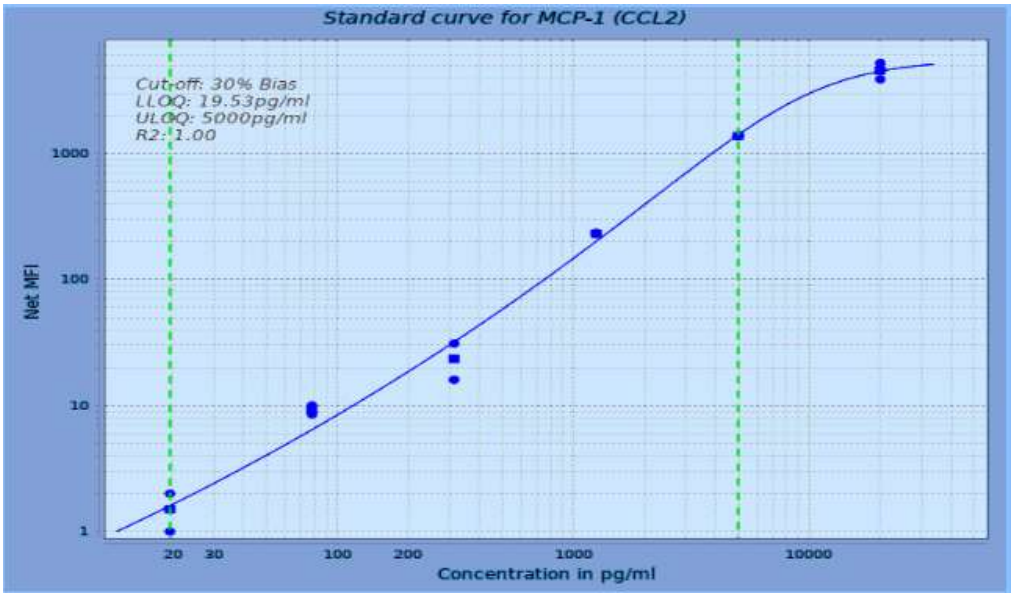


Figure 16 : courbe standard pour la cytokine MCP-1 (CCL2)

2-2-8. Analyse statistique des données

Le dépouillement des fiches de collecte a été manuel. Les données ont été saisies dans un tableur Excel 2021 et les tests statistiques ont été réalisés à l'aide des logiciels R (version 4.2.2) et GraphPad Prism (Version 5). Les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel 2021.

Les variables qualitatives ont été présentées sous forme de pourcentage et celles quantitatives en termes de moyenne ± l'écart type et/ou de médiane.

Afin de déterminer un lien entre le gène rs3077 et le portage chronique du virus de l'hépatite B, nous avons dans un premier temps regroupé les génotypes de manière à comparer les fréquences de chacun des allèles indépendamment de leur mode de transmission. Dans un second temps, nous avons regroupé les génotypes en considérant les modes de transmission possibles de chaque allèle que sont :

- le modèle dominant
  - ✓ CC + CT versus TT
  - ✓ TT + CT versus CC
- le modèle récessif
  - ✓ CC versus CT + TT
  - ✓ TT versus CC + CT
- le modèle codominant
  - ✓ CC versus CT versus TT
  - ✓ TT versus CT versus CC

Ce deuxième regroupement nous a permis de réaliser les analyses de manière à refléter un modèle biologique d'effet génique. Le lien entre les allèles C et T du gène rs3077 et le portage chronique du VHB a été analysé suivant les différents regroupements suscités en adoptant le paradigme de la statistique bayésienne pour l'inférence et en déterminant les odds ratio (OR) cas-témoins. À postériori, nous avons échantillonné la loi de distribution de ces OR afin de déterminer les intervalles de confiance. Nous avons alors décrit un allèle comme étant significativement lié au portage chronique du VHB selon un regroupement donné, lorsque l'intervalle de confiance de son OR cas-témoin ne contenait pas la valeur 1. Le sens de cette association était donné par la position de l'OR calculé par rapport à 1. Un OR inférieur à 1 signifiait que l'allèle concerné est un facteur protecteur. À contrario, une valeur d'OR supérieure à 1 signifie que le génotype ou l'allèle concerné est un facteur de risque.

Le lien entre la production de cytokines et le génotype présenté a été évalué en comparant les moyennes et les médianes. D'une part, nous avons déterminé des moyennes empiriques pour chaque cytokine ainsi que leur intervalle de confiance en fonction du génotype présenté via une procédure « Bootstrap » non paramétrique. Cette procédure a consisté à plusieurs calculs de moyennes sur des échantillons des valeurs observées tirés aléatoirement avec remise. En nous servant de l'algorithme de Monte-Carlo pour réaliser les rééchantillonnages, nous avons pu déterminer les intervalles de confiance des concentrations moyennes de cytokines. Nous avons considéré qu'il existait une différence significative entre les concentrations moyennes de cytokines d'un génotype à un autre si l'intersection de leur intervalle de confiance était vide. Par ailleurs, nous avons comparé les médianes de concentration des cytokines d'un génotype à l'autre par le test de Man Whitney. Nous concluions à une différence statistiquement significative si la *valeur p* du test était inférieure à 0,05.

2-2-9. Considérations éthiques

La réalisation de cette étude a reçu l'avis favorable n°151 du 03 aout 2022 du Comité d'Éthique de la Recherche de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (CER-ISBA). Le recrutement des sujets du groupe cas dans la Clinique Universitaire d'Hépato-Gastro-Entérologie du CNHU-HKM a été réalisé avec l'autorisation de la Direction de l'hôpital (N°1445/MS/CNHU-HKM/DAF/CSMR du 31 aout 2022). Le recrutement des sujets du groupe témoin à l'AD-ANTS Atlantique-Littoral a reçu l'autorisation N°1382/MS/ANTS/DG/DAF/DPAQH/SAQHHR/SA du 24 octobre 2022.

Chaque participant (cas comme témoin) s'est vu expliquer les tenants et aboutissants du travail de recherche et une note d'information a été remise. La participation à l'étude a été strictement conditionnée à l'obtention d'un consentement écrit du sujet.

Pour la conservation de l'anonymat, chaque participant s'est vu attribuer un numéro d'identification et aucune information nominale n'a été recueillie. Les renseignements cliniques et paracliniques obtenus dans le cadre de ce travail resteront strictement confidentiels.

3- Résultats

3-1- Caractéristiques sociodémographiques des sujets du groupe cas

3-1-1. Âge

Le tableau V présente la répartition des patients suivant les classes d'âge.

Tableau V : répartition des sujets du groupe cas selon l'âge (année)

	Effectif	**Pourcentage (%)**
[19-31]	12	25
]31-43]	16	33,3
]43-55]	14	29,2
]55-67]	6	12,5
Total	**48**	

Les sujets pris en compte dans notre étude étaient âgés de 19 à 67 ans. La distribution semblait égalitaire avec une médiane (41,5 ans) proche de la moyenne (41,208 ± 12,34 ans).

3-1-2. Sexe

Nous avons noté une prédominance masculine à 75% avec un sex-ratio de 3.

3-1-3. Ethnie

La figure 17 présente la répartition des sujets du groupe cas selon l'ethnie.

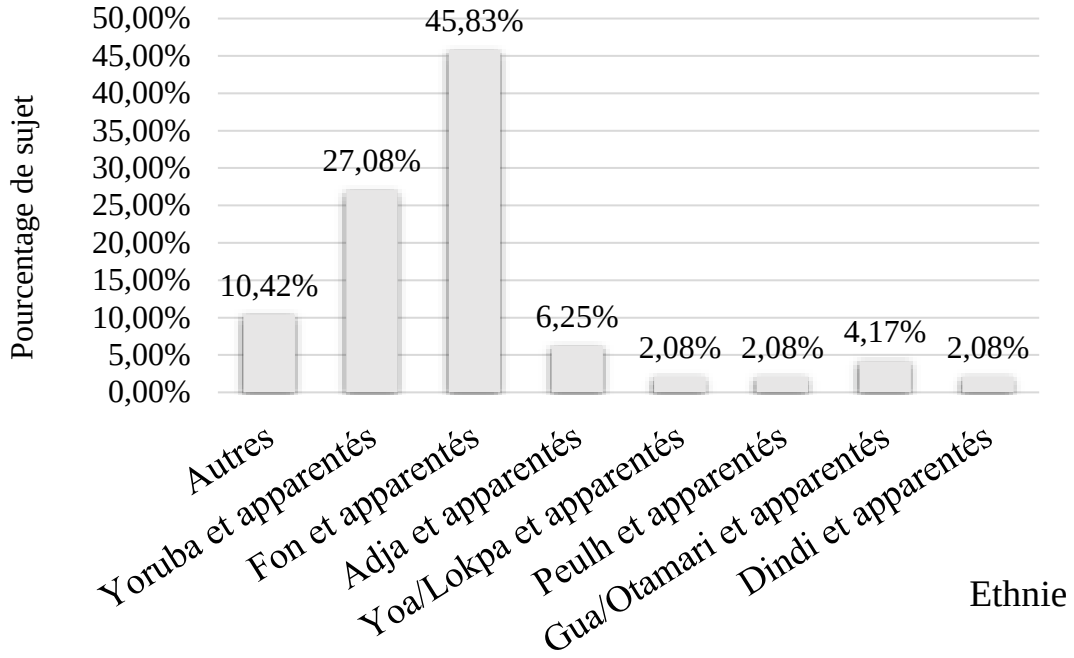


Figure 17 : répartition des sujets selon les ethnies (N=48)

Les ''Fon et apparentés'' étaient les plus représentés à 45,83% des cas.

3-1-4. Ville de résidence

La figure 18 présente la répartition des sujets du groupe cas selon la ville de résidence.

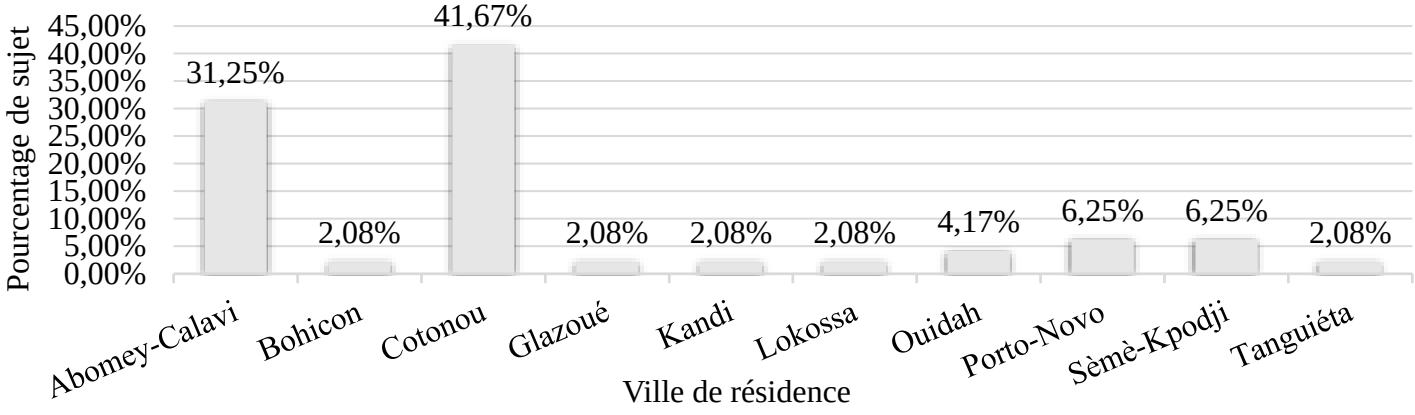


Figure 18 : répartition des sujets selon la ville de résidence (N=48)

Les sujets du groupe cas résidaient principalement à Cotonou et Abomey-Calavi.

3-2- Consommation d'alcool chez les porteurs chroniques du VHB

Chez 62,5 % des sujets étudiés, on notait une consommation de 10 à 310 g d'alcool par mois avec une médiane à 30 g. La distribution semblait inégale, car la moyenne (30,625±66,86 g/mois) était éloignée de la médiane (15g/l).

3-3- Autres potentiels hépatotoxiques

En dehors de la consommation d'alcool, la population étudiée ne présentait que la prise de tisane comme autre potentiel hépatotoxique. Celle-ci était retrouvée chez 66,67 % des sujets.

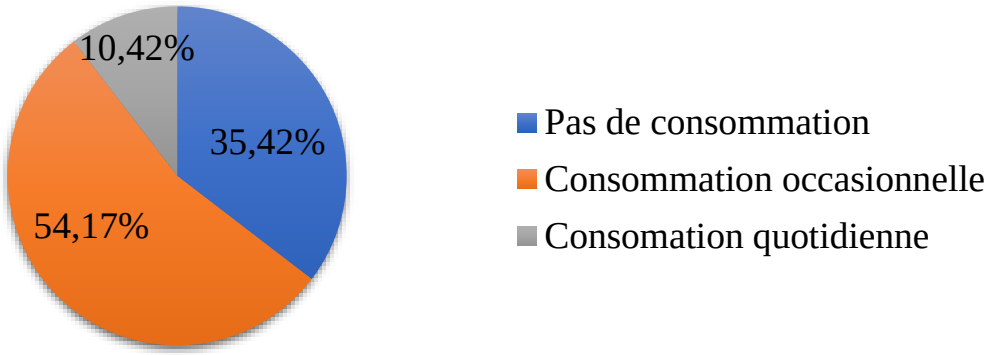


Figure 19 : consommation de tisane chez les sujets du groupe cas (N=48)

3-4- Autres pathologies chroniques

Les pathologies chroniques étaient retrouvées en faible proportion dans notre échantillon (8,16% ; 4/48). On notait un antécédent de diabète de type 2 chez 8,16% (4/48) de la population parmi laquelle un sujet avait en plus une insuffisance rénale chronique.

3-5- Co-infections

Les sérologies HIV, VHC et VHD étaient respectivement disponibles chez 85,42% (41/48), 81,25% (39/48) et 14,58% (7/48) des patients. Lorsque les

sérologies étaient disponibles, aucune co-infection avec le VIH, le VHC ou le VHD n'a été détectée.

3-6- Étape de l'histoire naturelle

La figure 20 montre la répartition des sujets du groupe cas selon le stade de l'histoire naturelle de l'infection au VHB.

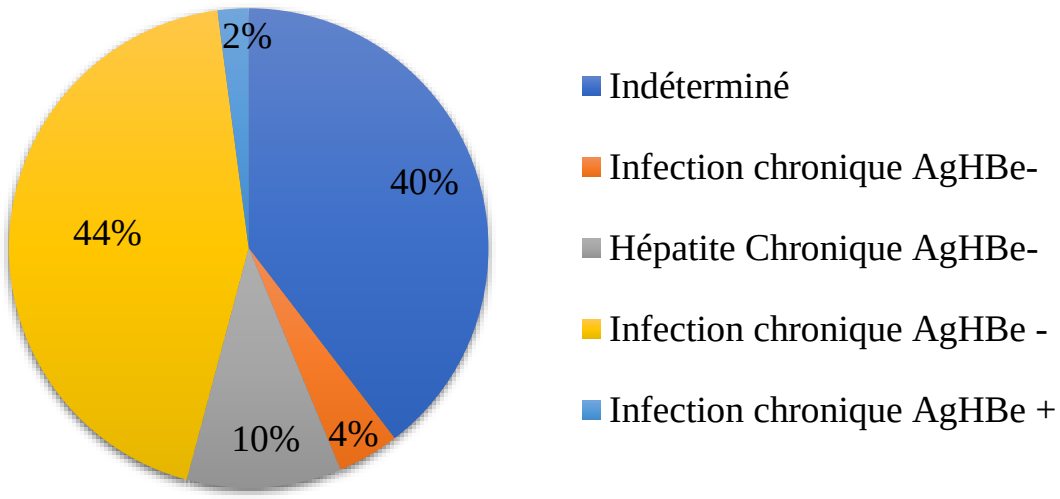


Figure 20 : répartition des sujets du groupe cas selon l'étape de l'histoire naturelle de l'infection (N=48)

Les données cliniques et paracliniques recueillies nous ont permis de déterminer l'étape de l'histoire naturelle chez 60,42% des patients. Ceux-ci étaient majoritairement au stade d'infection chronique AgHBe- (43,75%).

3-7- Évaluation de la fibrose hépatique chez les porteurs chroniques du VHB

La figure 21 montre la répartition des sujets du groupe cas selon le degré de fibrose hépatique.

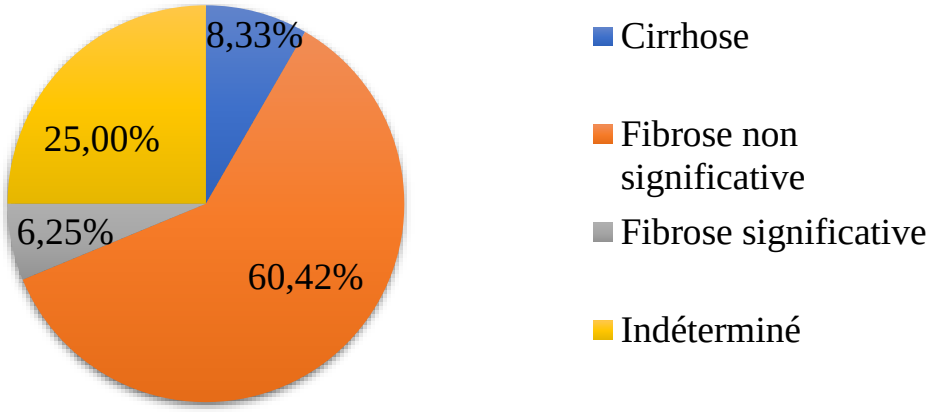


Figure 21 : niveau de fibrose hépatique chez les porteurs chroniques du VHB (N=48)

Nous avons pu conclure sur l'état du foie chez 75% de la population cas en nous basant sur le fibroscan® et/ou sur le score APRI. La fibrose était non significative (absente à minime) chez la majorité de la population étudiée (60,42%).

3-8- Carcinome hépatocellulaire chez les porteurs chroniques du VHB

La prévalence du carcinome hépatocellulaire dans la population étudiée était de 6,25% % (3/48). Les cas de CHC répertoriés étaient tous survenus sur foie cirrhotique.

3-9- Production de cytokines

Chez 28 sujets du groupe cas, nous avons dosé 21 cytokines. Les concentrations obtenues sont présentées par leurs paramètres de tendance centrale (moyenne et médiane) et de dispersion (maximum, minimum, écart type) dans le tableau VI.

Nous constatons que la médiane de concentration est de zéro pour 9 cytokines : G-CSF, GM-CSF, IFN α, IL-1 β, IL-2, IL-5, IL-6, IL-17A et TNF β. En particulier, l'IL-6 présente une moyenne de concentration proche de la médiane 0,15 pg/ml avec un écart-type de 0,78.

Tableau VI : paramètres de position et de dispersion des concentrations de cytokine (pg/ml) chez 28 cas

	G-CSF	*GM-CSF*	*IFN α*	*IFN γ*	*IL-1 β*	*IL-2*	*IL-4*	*IL-5*	*IL-6*	*IL-8*	*IL-10*
Moyenne	2,6	7,1	0,4	69,1	1,2	1,5	330,7	1,6	0,2	815,4	5,5
Médiane	0	0	0	47,4	0	0	258,4	0	0	469	0,8
Max	23,7	73,5	6,2	508,5	9,4	14,2	2467,4	36,9	4,1	3851,4	88,9
Min	0	0	0	4,1	0	0	0	0	0	0	0
Écart-type	5,4	16,9	1,3	96,2	2,4	3,7	465	7	0,8	1014,4	18

	IL-12p70	***IL-13***	***IL-17A***	***IL-18***	***IP-10***	***MCP-1***	***MIP-1 α***	***MIP-1 β***	***TNF α***	***TNF β***
Moyenne	38,8	8,1	13,7	70,1	1292,2	224,7	105,7	239,4	8,6	0,4
Médiane	21,2	7,3	0	62,5	688,5	141,7	32,2	181,2	3,8	0
Maximum	175,1	33,7	120,3	136,5	10240,7	738,2	1014,2	1037,1	40,1	9,9
Minimum	0	0	0	23,7	214,9	0	0,3	20,2	0	0
Ecart type	42	7,5	29,2	34,2	1858,5	219,4	204,2	237,5	9,7	1,9

3-10- Génotype

La répartition totale des génotypes rs3077 dans les deux populations d'étude est représentée dans la figure 22.

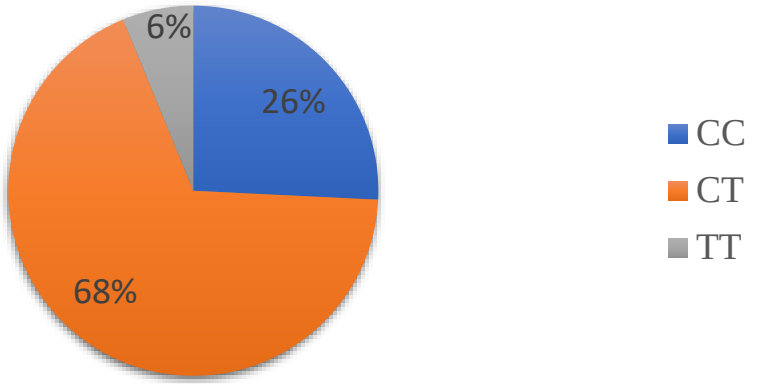


Figure 22 : répartition globale (cas + témoins) des génotypes du gène rs3077 (N=97)

On note une prédominance du génotype CT (68,04%). En considérant les deux populations, les fréquences alléliques totales étaient de 59,79% pour l'allèle C et 40,21% pour l'allèle T.

3-10-1. Groupe cas

La figure 23 présente la répartition des génotypes rs3077 au sein de la population cas.

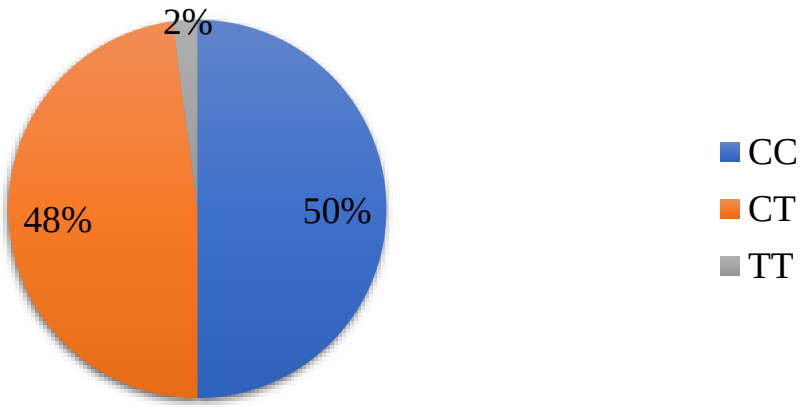


Figure 23 : répartition des sujets du groupe cas selon le génotype (N=48)

La moitié des sujets étaient de génotype CC. Au sein de ce groupe, l'allèle C était majoritaire, avec une fréquence de 73,9%.

3-10-2. Groupe témoin

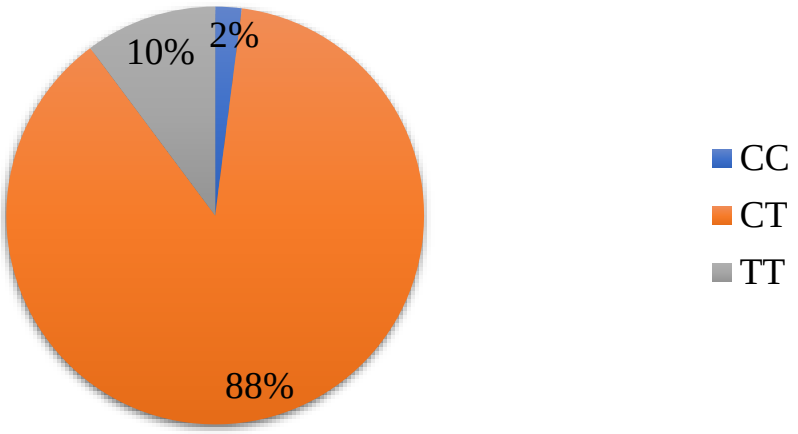


Figure 24 : répartition des sujets du groupe témoin selon le génotype (N=49)

Au sein de ce groupe témoin constitué de sujets testés AgHBs négatif, le génotype le plus représenté était celui CT avec une fréquence de 88%. L'allèle T était majoritaire avec une fréquence de 54,1%.

3-11- Analyse du lien entre portage chronique du VHB et le gène rs3077

3-11-1. Évaluation du lien entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 indépendamment du mode de transmission des allèles

Le tableau VII présente les odds ratios (OR) et leur intervalle de confiance pour un risque d'erreur de 95% (IC 95%) en tenant compte des effectifs de chaque allèle dans les populations cas et témoin étudiées.

Tableau VII : odds ratios cas témoins et intervalles de confiance déterminés indépendamment du mode de transmission des allèles

	Cas	Témoins	OR	IC 95%
Allèle C	71	45	**3,3**	**[1,8 ; 6,1]**
Allèle T	25	53	**0,3**	**[0,2 ; 0,5]**

On, remarque qu'indépendamment du mode de transmission, les allèles C et T du gène sont respectivement facteur de risque et facteur protecteur.

3-11-2. Lien entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 selon un modèle dominant

Le tableau VIII présente les odds ratios déterminés pour chaque allèle selon un modèle dominant.

Tableau VIII : odds ratios cas-témoin et intervalles de confiance pour chaque allèle selon un modèle dominant

	Regroupement	Cas	Témoins	OR	IC 95%
Allèle C	CC+ CT	47	44	6,6	[0,7 ; 29,1]
	TT	1	5		
Allèle T	TT+ CT	24	48	**0,04**	**[0,005 ; 0,1]**
	CC	24	1		

Selon un mode de transmission dominant, l'allèle T est un facteur protecteur. En d'autres termes, comparés aux homozygotes C, les sujets ayant au moins un allèle T (hétérozygotes et homozygotes T) bénéficient d'une certaine protection contre le portage chronique du VHB. Dans ce même modèle, nous ne

pouvons conclure sur le rôle de l'allèle C, car l'intervalle de confiance de l'odd ratio déterminé contient la valeur 1.

3-11-3. Lien entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 selon un modèle récessif

Le tableau IX présente les odds ratio déterminés pour chaque allèle selon un modèle récessif.

Tableau IX : odds ratio cas-témoin et intervalles de confiance pour chaque allèle selon un modèle récessif

	Regroupement	Cas	Témoins	OR	IC 95%
Allèle C	CC	24	1	**47,162**	**[6,754 ; 203,063]**
	CT+TT	24	48		
Allèle T	TT	1	5	0,38	[0,0034 ; 1,36]
	CC+CT	47	44		

On constate ainsi que dans un modèle récessif, l'allèle C est un facteur de risque. C'est-à-dire que comparé aux sujets ayant un et aucun allèle C (hétérozygotes et homozygotes T), les personnes homozygotes C sont exposées à un risque de chronicisation d'une infection au VHB. On ne peut conclure selon ce mode sur le statut protecteur ou à risque de l'allèle T du fait de la présence de la valeur 1 dans l'intervalle de confiance de l'odd ratio.

3-11-4. Lien entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 selon un modèle codominant

Le tableau X présente les odds ratios cas-témoin selon le mode de transmission codominant en précisant les intervalles de confiance à 95%.

Tableau X : odds ratios cas-témoins selon un mode codominant

	Cas			Témoins			OR	IC 95%
	CC	CT	TT	CC	CT	TT		
Allèle C (CC vs CT vs TT)	24	23	1	1	43	5	**49,8**	**[7,2 ; 213,6]**
Allèle T (TT vs CT vs CC)							0,4	[0,03 ; 1,4]

Notons que selon ce mode de transmission, on compare simultanément les trois génotypes possibles (CC, CT et TT) entre les deux populations d'étude. On remarque que selon ce mode, l'allèle C est un facteur de risque de survenue d'un portage chronique du VHB. On ne peut néanmoins pas affirmer que l'allèle T est un facteur protecteur, car l'intervalle de confiance de l'odd ratio déterminé contient la valeur 1.

3-11-5. Analyse du lien entre la production de cytokines et le génotype présenté au sein du groupe cas

Au sein de l'échantillon de 28 sujets du groupe cas seuls les génotypes CC (64,29%) et CT (35,71%) étaient représentés. Le tableau VIII présente les moyennes avec leurs intervalles de confiance déterminés par procédure bootstrap non paramétrique ainsi que les médianes de concentration des 21 cytokines en fonction du génotype.

On constate que les intersections des intervalles de confiance des concentrations moyennes de cytokine sont tous « Non-vides ». Cela suggère qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes de concentration de cytokine d'un génotype à un autre. De même, le test de Man-Whitney réalisé pour comparer les médianes ne note aucune différence statistiquement significative.

Tableau XI : moyenne et médiane de concentration (pg/ml) de cytokines en fonction du génotype (CC et CT)

Génotype CC											
	G-CSF	***GM-CSF***	***IFN α***	***IFN γ***	***IL-1 β***	***IL-2***	***IL-4***	***IL-5***	***IL-6***	***IL-8***	***IL-10***
Moyenne	2,7	8,9	0,3	54,8	1,2	1,3	243,2	2,5	0,2	687,01	3,2
IC 95%	0,5-5,8	1,1-19,3	0,01-0,7	34,6-77,9	0,2-2,5	0-3,34	147,2-351,8	0-7,1	0-0,7	317,7-364,2	0,6-7,3
Médiane	0	0	0	47,4	0	0	203,3	0	0	261,4	0,8
	IL-12p70	***IL-13***	***IL-17A***	***IL-18***	***IP-10***	***MCP-1***	***MIP-1 α***	***MIP-1 β***	***TNF α***	***TNF β***	
Moyenne	41,4	8,9	17,9	65,5	841,9	185,8	123,8	238	8,4	0,6	
IC 95%	22,9-63,2	49,9-82,1	4,1-35,4	49,9-82,1	588,3-1141,3	41,3-249	139,1-362	139,1-362	4,9-12,3	0-1,7	
Médiane	21,2	7,3	0	59,3	572,2	55,7	36,3	177,4	5,9	0	
Génotype CT											
	G-CSF	***GM-CSF***	***IFN α***	***IFN γ***	***IL-1 β***	***IL-2***	***IL-4***	***IL-5***	***IL-6***	***IL-8***	***IL-10***
Moyenne	2,1	2,2	0,1	49,1	1,3	0,9	268,2	0	0	1160,9	0,8
IC 95%	0-5,1	0-6,6	0-0,2	49,1-72,8	0-2,6	0-2,9	184,9-385,8	0-0	0-0	530,7-1955,7	0,3-1,7
Médiane	0	0	0	40,4	0	0	258,4	0	0	1058	0,8
Valeur P	0,8	0,5	0,5	1	0,6	1	0,7	**	**	0,2	0,6
	IL-12p70	***IL-13***	***IL-17A***	***IL-18***	***IP-10***	***MCP-1***	***MIP-1 α***	***MIP-1 β***	***TNF α***	***TNF β***	
Moyenne	30,5	5,98	6,1	75,4	1198,5	297,1	79,8	256,7	7,98	0	
IC 95%	9,7-57,5	2,1-10,5	0,7-14,4	57,5-96	832,6-1570,2	180,3-425,1	24,4-164,97	131,8-410,9	2,1-16,9	0-0	
Médiane	21,2	5,2	0	62,5	995,8	281	32,3	185,0	3,8	0	
Valeur P	0,54	0,3	0,9	0,5	0,1	0,05	0,9	0,7	0,5	**	

4- Discussion

4-1- Intérêt de l'étude

Au Bénin, l'infection par le virus de l'hépatite B est un problème majeur de santé publique. En effet elle est la principale cause de cirrhose et de carcinome hépato-cellulaire [92, 93]. Si beaucoup d'efforts sont faits dans la prévention de la maladie, la compréhension de sa physiopathologie souffre encore de quelques zones d'ombre. Notamment, la participation des prédispositions génétiques à la survenue d'un portage chronique du virus ainsi qu'aux complications qui en découlent n'a encore jamais été explorée. Or, une telle connaissance est un préalable important à de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, si les prédispositions génétiques s'avèrent être des facteurs de risque importants, il serait intéressant de les corréler à la réponse au traitement et d'évaluer l'utilité de les introduire dans les recommandations en matière de thérapeutique.

L'étude que nous avons réalisée est un premier pas dans l'analyse des facteurs génétiques prédisposant au portage chronique du VHB au Bénin et en Afrique subsaharienne.

Ce travail a également été la source de nombreux acquis. En effet, à nous même, chercheur, cette étude a permis l'apprentissage des techniques d'extraction d'ADN, de design d'amorces et de sondes alléliques, de réalisation et d'optimisation d'une réaction de polymérisation en chaine et de dosage par technique luminex® Xmap. Nous avons également pu acquérir des compétences en analyse statistique de données, particulièrement dans l'utilisation de la procédure bootstrap non paramétrique et dans les applications de l'algorithme de Monte-Carlo. Pour le laboratoire de cytogénétique, notre étude a été l'occasion d'élargir le champ d'application de la technique de génotypage par discrimination allélique Taqman à la détection de différences mononucléotidiques sur des gènes du système HLA.

4-2- Limites de l'étude

La détermination d'une taille convenable d'échantillon pour les deux groupes aurait nécessité de connaitre par des études préalables les chiffres exacts de fréquences des allèles du gène rs3077 chez les sujets porteurs chroniques du virus de l'hépatite B et en population générale.

Dans le cadre de notre travail de recherche, nous avons pris un échantillon représentatif des sujets porteurs du virus de l'hépatite B auquel nous avons opposé un nombre équivalent de sujets témoins. Afin d'avoir une force de comparaison plus importante, il aurait été plus intéressant de faire un appariement de deux à 5 témoins par cas. De plus, l'obtention d'un lien significatif entre le génotype présenté et la production de cytokine aurait nécessité un dosage immunologique étendu à un plus large échantillon de sujets. On pourrait aller plus loin en réalisant une comparaison des concentrations de cytokines chez des sujets de même génotype mais opposés par le portage du virus de l'hépatite B. Mais les couts élevés du génotypage ainsi que du dosage des cytokines constituaient un frein.

4-3- Méthodologie de travail

4-3-1. Choix du type d'étude

Le type d'étude réalisé était adapté à l'atteinte de nos objectifs. En effet, les enquêtes étiologiques dont font partie les études cas-témoins ont pour avantage de permettre d'étudier les associations entre des facteurs donnés et la survenue d'une maladie.

4-3-2. Biais de sélection et d'information

Le choix des sujets du groupe cas et du groupe témoin ne dépendait pas du facteur d'exposition qu'est le gène rs3077 du sujet. De plus la définition de cas a été basée sur le test ELISA dans les deux groupes. Une taille plus grande aurait néanmoins permis de s'assurer de la représentativité du groupe témoin par rapport à la population générale.

Les données cliniques et biologiques des sujets du groupe cas ont toutes été recueillies à l'aide d'une même fiche de collecte par nos soins. Les questions de la fiche d'enquête étaient au maximum fermées afin de limiter les biais d'informations liés au sujet enquêté. La classification des sujets selon le stade de l'histoire naturelle du portage chronique était basée sur les critères du guide de l'EASL (European Association for the Study of Liver) 2017 et tous les sujets dont les informations étaient insuffisantes ont systématiquement été classés « Indéterminé ». L'évaluation de la fibrose était basée sur le fibroscan et/le score APRI. Le génotype des sujets des deux groupes a été déterminé par PCR avec discrimination allélique par méthode Taqman. Cette technique de biologie moléculaire est la plus efficiente dans la détection des variations mononucléotidiques. Le dosage des cytokines a été réalisé de manière précise avec la technologie Luminex® Xmap qui possède une sensibilité similaire au test ELISA. L'utilisation de techniques spécifiques et sensibles de génotypage ainsi que de dosage de cytokine nous a permis de limiter les biais de mesure.

4-3-3. Validité de la méthode d'analyse des données

Nous avons choisi d'analyser le lien entre le portage chronique du VHB et le génotype en calculant les odds ratios plutôt qu'en réalisant un test chi 2 ou un test exact de Fischer. En effet, l'odd ratio était plus adéquat, car il nous informait sur la force, le sens et le degré de signification d'une éventuelle association. Par contre, un test chi 2 ne nous informerait que sur le degré de significativité de l'association.

Les cytokines ayant été dosées sur un échantillon relativement faible, la comparaison directe des moyennes arithmétiques par des tests statistiques ne nous aurait pas donné des informations fiables. De plus, les effectifs des différents génotypes étaient fortement inégaux et la concentration des diverses cytokines dans ces groupes ne semblait pas suivre une loi normale. L'usage des tests paramétriques (ANOVA, test de Student) courants n'était donc pas justifié, car

ceux-ci réalisent une supposition sur la loi de distribution (loi normale, loi de poisson, etc..) de la variable étudiée. Les tests non paramétriques étaient donc plus adéquats pour la comparaison des groupes de génotypes selon le paramètre « concentration de cytokines ». Ainsi, la procédure bootstrap non paramétrique et le test de Man Whitney étaient respectivement préférables pour la comparaison des moyennes et des médianes.

4-4- Atteinte des objectifs

Le type d'étude, les techniques d'échantillonnage, de réalisation des tests biologiques et d'analyse des données nous ont permis d'atteindre les objectifs préalablement fixés.

Nous avons évalué les facteurs de risque présentés par les sujets porteurs chroniques du VHB qu'étaient l'âge, le sexe, les co-infections et les maladies chroniques. Additionnellement, nous avons décrit les habitudes de consommation d'hépatotoxiques (alcool et tisanes essentiellement) qui, associés au terrain de portage chronique du VHB exposent à un risque accru de survenue de complications.

Nous avons pu déterminer les répartitions alléliques et génotypiques du gène rs3077 chez les porteurs chroniques du VHB et chez les sujets non infectés. En comparant ces répartitions entre les deux groupes, nous avons pu établir l'association entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 à Cotonou.

S'agissant de la production de cytokines, outre la comparaison des taux de production de cytokines d'un génotype à l'autre dans le groupe des sujets porteurs chroniques du VHB nous avons également pu constater des tendances globales de non-production de certains types particuliers de cytokines.

4-5- Caractéristiques sociodémographiques des porteurs chroniques du VHB

4-5-1. Âge des porteurs chroniques du VHB

Sur notre effectif de 48 porteurs chroniques du VHB, l'âge moyen était de 41,208±12,34 ans. Les sujets âgés de 31 à 43 ans étaient majoritaires, représentant 33,33% de la population. On a constaté que 97,92% de notre population d'étude était âgée de plus de 20 ans (âge maximal des sujets nés après introduction au PEV du vaccin contre l'hépatite B au moment de notre étude). Les constats concernant l'âge des porteurs chroniques du VHB dans notre étude semblent se superposer aux données de séroprévalence relevées par ***Kpossou et al.*** [11] en 2019. Dans cette étude importante ayant démontré la régression de la séroprévalence du VHB au Bénin, les chercheurs ont constaté que sur 545 sujets testés positifs à l'AgHBs lors d'une campagne de dépistage de masse, 527 soit 96,69% étaient nés avant l'introduction du vaccin. L'âge moyen des séropositifs au VHB était de 35,5±12,3 et la classe la plus représentée était celle des 28 à 41 ans avec 43,12%. Ainsi la séroprévalence globale au VHB tout comme le portage chronique du VHB semblent être plus importants chez les sujets nés avant l'introduction du vaccin contre l'hépatite B au PEV. L'effort national de vaccination contre le VHB est un facteur important pour la lutte contre l'infection. L'introduction de la vaccination systématique à la naissance en 2020 contre le VHB pourrait à l'avenir contribuer au recul de l'infection. Il faudrait néanmoins en évaluer l'effet.

4-5-2. Sexe des porteurs chroniques du VHB

Nous avons retrouvé dans notre étude une forte prédominance masculine avec un sex-ratio de 3. La même prédominance masculine était retrouvée par ***Kpossou et al.***[11] en 2019 mais avec un sex-ratio de 2,01. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que cette étude prenait en compte une plus grande population. Par ailleurs, dans l'étude de ***Kpossou et al.*** [11] tous les sujets

séropositifs à l'AgHBs sans distinction sur le caractère aigüe ou chronique de l'infection avaient été inclus.

4-5-3. Ethnie et ville de résidence des porteurs chroniques du VHB

Les Fons (45,83%), les Yorubas (27,08) et apparentés étaient les plus représentés. La majorité des sujets habitaient Cotonou (41,67%) ou Abomey-Calavi (31,25%). Cela se justifie par le fait que les porteurs chroniques du VHB ont été recrutés au CNHU-HKM.

4-6- Consommation d'alcool et de tisanes chez les porteurs chroniques du VHB

La consommation d'alcool, retrouvée chez 62,5 % des patients, était en moyenne de 30,625±66,86 g/mois. Ceux-ci étaient essentiellement des patients en début de suivi. La majorité des patients suivis depuis plus d'un mois déclaraient ne pas consommer d'alcool. Ces résultats démontrent l'impact du counseling sur les mesures hygiéno-diététiques dans la prise en charge du portage chronique du VHB. Cela étant, il faut tenir compte du fait que les patients pourraient donner des réponses socialement valorisantes.

S'agissant de la consommation de tisane, elle était retrouvée chez 64,59% des porteurs chroniques. Et 10,42% en consommaient de manière quotidienne. En l'absence de recul sur l'innocuité de ces tisanes, l'abstention de toute ingestion serait préférable. Les affections pour lesquelles la phytothérapie était prise n'étaient pas toujours énoncées.

4-7- Co-infections et autres maladies chroniques

Aucune co-infection avec le VIH, le VHD ou le VHC n'a été détectée. L'absence de toute co-infection dans notre étude est attribuable à la faible taille d'échantillon investiguée mais aussi au fait que les données de sérologie n'étaient pas disponibles chez tous les patients, ceux-ci étant en début de suivi. Certaines co-infections auraient donc pu passer inaperçues. En 2015, ***Dovonou et al.*** [94]

ont retrouvé 16,9 % d'infection au VHB chez les personnes infectées au VIH à Parakou. Des co-infections avec le VHD avaient été reportées par ***Sawadogo et al***. [94] au Burkina Faso (3,38%) en 2016 et ***Kpossou et al.*** [95] au Bénin (3,8%) en 2019.

En ce qui concerne les autres maladies chroniques, l'observation de 6,38% de sujets diabétiques au sein des porteurs chroniques du VHB semblait être supérieure aux 3,85% reportés chez les séropositifs à l'AgHBs par ***Kpossou et al***. en 2019 [11]. La différence entre ces deux observations provient probablement de la taille de l'échantillon enquêté.

4-8- Évaluation de la fibrose hépatique chez les porteurs chroniques du VHB

La majorité (60,42%) des sujets inclus présentaient un niveau non significatif de fibrose. On retrouvait une fibrose significative (modérée ou sévère) chez 6,25 %. ***Camara et al.*** [97] en Côte d'Ivoire retrouvaient au cours de l'année 2016, une fréquence moindre de fibrose non significative (32,8%) et une proportion plus élevée de sujets ayant une fibrose modérée ou sévère (28,3%). Cette différence dans les observations s'explique par l'insuffisance de données cliniques et paracliniques pour une classification complète de tous les sujets de notre travail, la diversité des scores diagnostiques utilisés et le type d'étude réalisé. En effet, ***Camara et al***. [97] avaient réalisé une étude prospective sur une durée d'un an où la stadification de la fibrose hépatique était basée sur l'élastographie impulsionnelle et/ou le fibrotest®.

4-9- Carcinome hépatocellulaire chez les porteurs chroniques du VHB

La fréquence du CHC dans notre étude était de 8,33% (4 patients). Il survenait majoritairement sur foie cirrhotique (3/4 soit 75%). En 2016, ***Kpossou et al.*** [92] ont noté que 54,3 % des cas de carcinome hépatocellulaire suivis dans la Clinique Universitaire d'Hépato-gastro-entérologie du CNHU-HKM survenaient sur foie cirrhotique. Cette observation était étendue à tous les cas de

CHC, survenant ou non sur un terrain d'hépatite virale B. Cela explique la plus faible proportion de CHC sur foie cirrhotique comparée à notre étude qui n'a porté que sur les porteurs chroniques du VHB.

4-10- Gène rs3077 et portage chronique du VHB

Notre étude réalisée sur population mélanoderme a conclu que le gène rs3077 présente un lien avec le portage chronique du VHB. La comparaison directe des fréquences allélique montre que les allèles C et T sont respectivement facteur de risque et facteur protecteur. En tenant compte des modes possibles de transmission, l'allèle T est un facteur protecteur selon le modèle dominant. L'allèle C est quant à lui un facteur de risque selon les modèles récessif et codominant.

4-10-1. Comparaison avec des populations américaines

Thomas et al. [98] en 2012, dans une subcohorte afro-américaine cas-témoins, ont examiné le lien entre le gène rs3077 et la séroclairance du VHB (Groupe témoins constitué uniquement de sujets ayant eu une clairance spontanée au VHB). Les chercheurs ont jugé ce lien faible malgré une *valeur p* de 0,02 et n'ont donc pas investigué le sens de cette association, se concentrant plutôt sur le gène rs9277534 de la région HLA DPB1 qui montrait la plus forte association (*valeur p 0,0001)*.

Toutefois, notre observation selon laquelle l'allèle T est un facteur protecteur indépendamment du modèle de transmission concorde avec les travaux de ***Trinks et al.*** [99] en 2017 chez des sujets caucasiens originaires du centre de l'Argentine, pays d'Amérique du sud (OR 0,63 ; IC95% 0,45-0,87).

4-10-2. Comparaison avec des populations asiatiques

Nos observations concernant l'allèle T ont été également rapportées dans de nombreuses études en Asie. En 2009, ***Kamatani et al.*** [100] dans une étude d'association génomique à grande échelle incluant des sujets originaires du Japon

et de la Thaïlande ont prouvé que l'allèle T, minoritaire en population asiatique, est un facteur protecteur contre le portage chronique du VHB (OR 0,56 ; IC95% 0.51-0,61) indépendamment du mode de transmission. Ces derniers n'ont cependant pas testé les divers modèles de transmission. En 2011, ***An et al***. [8] ont observé au sein d'une population chinoise, que l'allèle T est facteur protecteur selon les modèles dominant (OR 0,62 ; IC95% 0,47-0,83) et codominant (OR 0,68 ; IC95% 0,55-0,84). En 2012, ***Nishida et al.*** [101] ont quant à eux rapporté le rôle protecteur de l'allèle T en population japonaise et coréenne, indépendamment du mode de transmission (OR 0,46 ; IC95% 0,39–0,54).

En Chine, certains auteurs ont aussi analysé le rôle du gène rs3077 dans le portage chronique du VHB. Le tableau XII en montre un aperçu. De manière générale, ces travaux s'accordent sur le rôle protecteur de l'allèle T. Les intervalles de confiance obtenus par ces auteurs sont plus restreints, car ceux-ci ont investigué une plus grande taille d'échantillon.

Tableau XII : comparaison des odds ratio obtenu dans notre étude avec ceux d'études réalisées en Chine

		Étude actuelle	***Wong et al.* 2013** [102]	***Song et al. 2021*** [103]
Comparaison directe des fréquences alléliques	C	**3,3 (1,8 -6,1)**	**	**1,7 (1,4-2,02)**
	T	**0,3 (0,2-0,5)**	**0,7 (0,5-0,9)**	**0, 6 (0,5-0,8)**
Modèle dominant	C	6,7 (0,7-29,1)	**	**
	T	**0,04 (0,005-0,1)**	**0,6 (0,5-0,9)**	**
Modèle récessif	C	**47,2 (6,8-203,1)**	**	**
	T	0,38 (0,03-1,4)	**	**
Modèle codominant	C	**49,8 (7,2-213,6)**	**	**
	T	0,4 (0,03-1,4)	**0,7 (0,5-0,9)**	**

** : Non renseigné dans l'article de référence

En gras : association significative

4-10-3. Comparaison avec des populations européennes

Nos conclusions sur l'allèle C correspondent à celles de ***Koukoulioti et al***. [9] et de ***Vermehren et al.*** [6] en Europe de l'Ouest. Ces derniers ont obtenu des intervalles de confiance plus restreints du fait de la grande taille de l'échantillon investigué.6

Tableau XIII : comparaison des odds ratio obtenu dans notre étude à ceux des travaux sur population caucasienne d'Europe de l'Ouest

		Étude actuelle	*Koukoulioti et al. 2019* [9]	*Vermehren et al. 2012* [6]
Comparaison directe des fréquences alléliques	C	**3,3 (1,8 -6,1)**	**1,4 (1,1-1,9)**	
	T	**0,3 (0,2-0,5)**	**	**
Modèle dominant	C	6,7 (0,7-29,1)	**1,5 (1,1-2)**	1.2 (0.8–1.8)
	T	**0,04 (0,005-0,1)**	**	**
Modèle récessif	C	**47,2 (6,8-203,1)**	1,6 (0,7-3,6)	**5,1 (1,9–13,7)**
	T	0,38 (0,03-1,4)	**	**
Modèle codominant	C	**49,8 (7,2-213,6)**	**	**
	T	0,4 (0,03-1,4)		**

** : Non renseigné dans l'article de référence

En gras : association significative

Les études ouest-européennes sus citées corroborent nos conclusions. Toutefois, en Europe de l'est ***, Akgöllü et al*** [104] en 2017 dans leur étude cas-témoin réalisée en Turquie ne rapportaient aucun lien entre le gène rs3077 et le portage chronique du VHB. Et ceci malgré le fait que les fréquences alléliques observées dans les deux groupes soient proches de celles reportées par les travaux ouest-européens. Ce constat est attribuable à la forte variabilité des gènes du CMH de classe II d'un groupe ethnique à un autre.

4-11- Production de cytokines chez les porteurs chroniques du VHB

Indépendamment du génotype et quelle que soit l'activité hépatique et virale, 9 cytokines (G-CSF, GM-CSF, IFN α, IL-1 β, IL-2, IL-5, IL-6, IL-17A et

TNF β) présentaient une médiane de concentration de 0 pg/ml. Certaines de ces cytokines comme le G-CSF et le GM-CSF sont des facteurs de stimulation des lignées blanches normalement produits par les cellules NK lors de l'infection par le virus de l'hépatite B. D'autres, telle que l'IFN α, IL-6,IL-2 et L'IL1 ont fait les preuves de leur activité antivirale [70]. L'IFN α dans sa forme pégylée est parfois indiquée dans le traitement de l'hépatite B [12]. Cette tendance centrale à la non-production des cytokines suscitées pourrait être due à l'échec de la réponse immunitaire à contrôler l'infection. La faible taille de l'échantillon limite notre interprétation, mais les résultats pourraient être un apport à la compréhension de la physiopathologie du portage chronique du VHB.

Nous n'avons noté aucune différence statistiquement significative entre les moyennes de concentration de cytokines d'un génotype à l'autre. Trouver un lien statistiquement significatif entre la production de cytokine et le génotype au sein d'une population de sujets porteurs chroniques du VHB nécessiterait une plus grande taille d'échantillon. Néanmoins, des tendances sont particulièrement intéressantes à noter. C'est le cas de la cytokine MCP-1 dont la concentration au sein de l'échantillon étudié est en termes de moyenne et de médiane 1,59 fois et 4,97 fois plus élevée chez les individus de génotype CT que chez ceux de génotype CC. Des constats similaires sont faits pour l'IL-8 où les rapports (CT/CC) des moyennes et des médianes sont respectivement de 1,52 et 3,59. Il en est de même pour la cytokine IP-10 (CXCL-10) avec un rapport (CT/CC) de 2,49 pour la moyenne et 2,33 pour la médiane

Conclusion

L'infection par le virus de l'hépatite B est endémique au Bénin mais la compréhension de sa physiopathologie souffre encore de certaines zones d'ombre. Notre étude nous a permis d'évaluer le lien entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 tout en décrivant brièvement les autres facteurs de risque de chronicisation présentés par les porteurs chroniques.

Nos travaux nous ont permis de constater que le portage chronique du VHB est plus fréquent chez les hommes. Nous avons également noté un impact important de l'introduction au PEV du vaccin contre ce virus.

Indépendamment du mode de transmission, les allèles C et T sont respectivement facteur de risque et facteur protecteur vis-à-vis du portage chronique du VHB. En tenant compte des modes de transmission possibles, l'allèle T est un facteur protecteur uniquement selon le modèle dominant. Tandis que l'allèle C est un facteur de risque selon les modèles récessif et codominant.

Toutefois, nous n'avons pas noté de différence statistiquement significative entre les moyennes et les médianes de production de cytokine d'un génotype à l'autre chez les porteurs chroniques.

Ce travail, réalisé pour la première fois dans notre pays peut être considéré comme une étude pilote. Les résultats obtenus et les limites rencontrées inspirent certaines perspectives. Les prochaines étapes pourraient consister à :

- consolider nos résultats en réalisant une étude d'association génomique à grande échelle (plus de participant, plusieurs sites de recrutement) tout en incluant d'autres gènes de susceptibilité répertoriés tels que rs2856718, rs9277535, rs7453920, rs9275572 ;
- étudier plus précisément le rôle des facteurs génétiques dans la séroclairance au VHB. Cela pourrait se faire au moyen d'études cas-témoins opposant des porteurs chroniques à des sujets ayant eu une clairance spontanée au virus;

- réaliser des études prospectives dans le but d'observer les effets des prédispositions génétiques sur l'évolution de l'infection mais aussi sur la réponse à la thérapie.

L'influence du gène rs3077 sur la production de cytokines chez les porteurs chroniques du VHB mériterait d'être étayée dans une étude sur un échantillon de plus grande taille. Afin de réduire les coûts de recherche, on pourrait dans un premier temps se limiter au MCP- 1, à l'IL-8 et à l'IP10 car ces cytokines ont montré des tendances particulières. Par ailleurs, la piste de la non production de certaines cytokines (G-CSF, GM-CSF, IFN α, IL-1 β, IL-2, IL-5, IL-6, IL-17A et TNF β) chez les porteurs chroniques du VHB devrait être investiguée. Pour se faire, on pourrait comparer des porteurs chroniques à des sujets présentant une clairance spontanée. Cela permettrait d'identifier des cytokines ayant un rôle majeur dans l'infection. Une telle connaissance est une base pour la proposition d'essais thérapeutiques à bases d'agonistes ou d'antagonistes de ces cytokines en fonction de l'effet qui leur sera découvert.

Suggestions

SUGGESTIONS

Afin d'améliorer les connaissances actuelles sur les prédispositions génétiques au passage à la chronicité d'une infection par le VHB, nous suggérons :

- **à la communauté scientifique béninoise**
  - ✓ de mener des études d'association génomique à grande échelle afin de vérifier avec certitude l'influence des prédispositions génétiques sur le portage chronique du VHB mais aussi sur la réponse au traitement ;
- **aux autorités politico-administratives**
  - ✓ d'octroyer des fonds plus importants à la recherche scientifique

Par ailleurs, afin de renforcer la surveillance épidémiologique de l'infection au VHB, nous suggérons également :

- **aux autorités politico-administratives** de rendre gratuit le dépistage de la maladie, non pas seulement pour les populations à risque mais pour tous. Ceci est d'autant plus important que la séroprévalence au VHB est supérieure à celle au VIH.

Enfin, notre rôle en tant que soignant étant entre autres de prévenir les maladies, nous préconisons **:**

- **à la population béninoise** un dépistage systématique annuel avec vaccination en cas de séronégativité.

Références

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Tong S et Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. J Hepatol. 2016 ; 64 : 4–16.

[2] Ganem D et Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. Annu Rev Biochem. 1987 ; 56 : 651–93.

[3] Ganem D et Prince AM. Hepatitis B virus infection: Natural history and clinical consequences. New Engl J Med. 2004 ; 350 : 1118–29.

[4] Bouillon M et Mourad WM. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II : diversité fonctionnelle. Médecine/Sciences. 2003 ; 19 : 988–93.

[5] Tai D-I et Tai J. The role of genetic factors in HBV-related HCC: perspectives from local genetic backgrounds and clinical epidemiology. Hepatoma Res. 2020 ; 6 : 1–12.

[6] Vermehren J, Lötsch J, Susser S, Wicker S, Berger A, Zeuzem S et al. A common HLA-DPA1 variant is associated with hepatitis B virus infection but fails to distinguish active from inactive caucasian carriers. PLoS One. 2012 ; 7 : 1–5.

[7] Hu L, Zhai X, Liu J, Chu M, Pan S, Jiang J et al. Genetic variants in human leukocyte antigen/DP-DQ influence both hepatitis B virus clearance and hepatocellular carcinoma development. Hepatology. 2012 ; 55 : 1426–31.

[8] An P, Winkler C, Guan L, O'Brien S et Zeng Z. A Common HLA–DPA1 variant is a major determinant of hepatitis B virus clearance in Han Chinese. J Infect Dis. 2011 ; 203 : 943–47.

[9] Koukoulioti E, Fischer J, Schott E, Fülöp B, Heyne R, Berg T et al. Association of HLA-DPA1 and HLA-DPB1 polymorphisms with spontaneous HBsAg seroclearance in Caucasians. Liver Int. 2019 ; 39 : 646–54.

[10] Mardian Y, Yano Y, Wasityastuti W, Ratnazari N, Liang Y, Putri W A et al. Genetic polymorphisms of HLA-DP and isolated anti-HBc are important subsets of occult hepatitis B infection in Indonesian blood donors: a case-control study. Virol J. 2017 ; 14 : 201–11.

[11] Kpossou AR, Paraiso MN, Sokpon CN, Alassan KS, Vignon RF, Keke RK et al. Hépatite virale B lors d´une campagne de dépistage en population générale au Bénin: séroprévalence et facteurs associés. Pan Afr Med J. 2020 ; 37 : 1–12.

[12] Lampertico P, Agarwal K, Berg T, Buti M, Janssen HLA, Papatheodoridis G et al. EASL 2017 clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2017 ; 67 : 370–98.

[13] Jean-Pierre H et Pierre-Henri G. Précis de génétique des populations. Elsevier Masson SAS, 1998.

[14] Lisa DB SNPs: Why do we care? Dans : Pui-Yan K (ed) Single nucleotide polymorphisms: Methods and protocols. Totowa : Humana Pres Inc ; 2003. 1–14.

[15] Drale RL, Vogl AW et Mitchell MWA. Abdomen. Dans: Drale RL, Vogl AW, Mitchell MWA (eds) Gray's anatomie pour les étudiants. Elsevier Masson SAS ; 2020. 230–378.

[16] Kamina P. Appareil hépato-biliaire. Dans : Kamina P (ed) Anatomie clinique. Editions Maloine ; 2009. 289–313.

[17] Marieb EN, Hoehn K. Le système digestif. Dans : Anatomie et physiologie humaines. Edition du renouveau pédagogique ; 2010. 1001–67.

[18] Wheater P, Burkitt HG et Daniels VG. L'appareil gastro-intestinal. In: Functional Histology. Churchill Livingstone : MEDSI ; 1979.171–207.

[19] Perkin J. Représentation de la particule du VHB [Internet]. Lille : Anne

Goffard ; publié en 2010 (Consulté le 1 janvier 2023). Disponible à partir de http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2010_Lille_Goffard_VHB/co/03_generalites.html (2002, accessed 1 January 2023).

[20] Vaillant A. HBsAg, Subviral particles, and their clearance in establishing a functional cure of chronic hepatitis B virus infection. ACS Infect Dis. 2021 ; 7 : 1351–68.

[21] Hu J et Liu K. Complete and incomplete hepatitis B virus particles: Formation, function, and application. Viruses. 2017 ; 9 : 1–17.

[22] Grob PJ et Frei PC. Virus et pathogénie de l'hépatite B. Sozial- und Präventivmedizin.1998 ; 43 : 79–83.

[23] Soussan P, Garreau F, Zylberberg H, Ferrey C, Brechot C, et Kremsdorf D. In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. J Clin Invest. 1999 ; 105 : 1–6.

[24] Emile E. Le gène X du virus de l'hépatite B : transactivateur et oncogène potentiel. Médecine/Sciences. 1992 ; 8 : 16–25.

[25] Billioud G et Ait-Goughoulte M. Cycle de réplication du VHB et molécules antivirales. Virologie. 2010 ; 14 : 57–73.

[26] Allain J-P. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. J Clin Virol. 2006 ; 36 : 12–17.

[27] Sureau C et Salisse J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. Hepatology. 2013 ; 57 : 985–94.

[28] Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. Gastroenterology.

2014 ; 146 : 1–14.

[29] Watashi K et Wakita T. Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus entry, species specificity, and tissue tropism. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 ; 5 : 1–11.

[30] Kann M, Schmitz A et Rabe B. Intracellular transport of hepatitis B virus. World J Gastroenterol. 2007 ; 13 : 39–47.

[31] Guo H, Mao R, Block TM, et Guo J-T. Production and Function of the Cytoplasmic Deproteinized Relaxed Circular DNA of Hepadnaviruses. J Virol. 2010 ; 84 : 387–96.

[32] Urban S, Schulze A, Dandri M, et Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. J Hepatol. 2010 ; 52 : 282–84.

[33] Organisation Mondiale de la Santé. Principaux repères sur l'hépatite B [Internet]. Genève : WHO ; publié le 14 juillet 2020 (Consulté le 21 juillet 2022). Disponible à partir de https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b.

[34] Ranger-Rogez S, Alain S et Denis F. Virus des hépatites : transmission mère-enfant. Pathol Biol. 2002 ; 50 : 568–75.

[35] Wagner A, Denis F, Ranger-Rogez S, Loustaud-Ratti V et Alain S. Génotypes du virus de l'hépatite B. Immuno-analyse Biol Spécialisée. 2004 ; 19 : 330–42.

[36] Kammerlander R et Zimmermann H. Transmission de l'hépatite B. Soz Praventivmed. 1998 ; 1 : 105– 7.

[37] Sangaré L, Sombié R, Combasséré AW, Kouanda A, Kania D, Zerbo O et al. Transmission anténatale du virus de l' hépatite B en zone de prévalence modérée du VIH, Ouagadougou,Burkina Faso. Bull la société Pathol Exot. 2009 ; 102 : 226–9.

[38] Beasley RP et Hwang L-Y. Postnatal infectivity of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. J Infect Dis. 1983 ; 147 : 185–90.

[39] Hershow RC, Hadler SC et Kane MA. Adoption of children from countries with endemic hepatitis B: transmission risks and medical issues. Pediatr Infect Dis J. 1987 ; 6 : 431–7.

[40] Ratnam D et Visvanathan K. New concepts in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B: The importance of the innate immune response. Hepatol Int. 2008 ; 2 : 12–8.

[41] Liang TJ. Hepatitis B: The virus and disease. Hepatology. 2009 ; 49 : 13–21.

[42] Visvanathan K et Lewin SR. Immunopathogenesis: Role of innate and adaptive immune-responses. Semin Liver Dis. 2006 ; 26 : 104–15.

[43] Trobonjaca Z, Leithäuser F, Möller P, Schirmbeck R et Reimann J. Activating Immunity in the Liver. I. Liver Dendritic Cells (but Not Hepatocytes) Are Potent Activators of IFN-γ Release by Liver NKT Cells. J Immunol. 2001 ; 167 : 1413–22.

[44] Kiminori K, Kazuhiro K, Guidotti LG, et Chisari F. Interleukin-18 Inhibits Hepatitis B Virus Replication in the Livers of Transgenic Mice. J Exp Med. 2000 ; 191 : 1247–52.

[45] Guidotti LG et Chisari F V. Noncytolytic Control of Viral Infections by the Innate and Adaptive ImmuneResponse. Annu Rev Immunol. 2001 ; 19 : 65–91.

[46] Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP et Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: Function and Regulation by Innate Cytokines. Annu Rev Immunol. 1999 ; 17 : 189–220.

[47] Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, et Chisari FV. Natural killer T cell

activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. J Exp Med. 2000 ; 192 : 921–30.

[48] Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti L G et Chisari F V. Activated Intrahepatic Antigen-Presenting Cells Inhibit Hepatitis B Virus Replication in the Liver of Transgenic Mice. J Immunol. 2002 ; 169 : 5188–95.

[49] Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghrayeb J, Reimann K A, Purcell RH et al. CD8 + T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection . J Virol. 2003 ; 77 : 68–76.

[50] Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. Gut. 2009 ; 58 : 974–82.

[51] Grimm D, Heeg M et Thimme R. Hepatitis B virus : from immunobiology to immunotherapy. Clin Sci. 2013 ; 124 : 77–85.

[52] Webster GJM, Reignat S, Maini MK, Whaley SA, Ogg GS, King A et al. Incubation phase of acute hepatitis B in man : dynamic of cellular immune mechanisms. Hepatology. 2000 ; 32 : 1117–24.

[53] Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R et al. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor–mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. Hepatology. 2009 ; 49 : 1132–40.

[54] Kondo Y, Kobayashi K, Asabe S, Shiina M, Nitsuma H, Ueno Y et al. Vigorous response of cytotoxic T lymphocytes associated with systemic activation of CD8+ T lymphocytes in fulminant hepatitis B. Liver Int. 2004 ; 24 : 561–7.

[55] Baumert TF, Yang C, Schürmann P, Köck J, Ziegler C, Grüllich C et al. Hepatitis B virus mutations associated with fulminant hepatitis induce

apoptosis in primary tupaia hepatocytes. Hepatology. 2005 ; 41 : 247–56.

[56] Moradi A, Zhand S, Ghaemi A, Basouri M et Tabarraeï A. Mutations in pre-core and basal-core promoter regions of hepatitis B virus in chronic HBV patients from Golestan, Iran. Iran J Basic Med Sci. 2014 ; 17 : 370–7.

[57] Wieland SF et Chisari F V. Stealth and Cunning : Hepatitis B and Hepatitis C viruses. J Virol. 2005 ; 79 : 9369–80.

[58] Jindal A, Kumar M et Sarin SK. Management of acute hepatitis B and reactivation of hepatitis B. Liver Int. 2013 ; 33 : 164–75.

[59] Golsaz-shirazi F et Shokri F. Hepatitis B immunopathogenesis and immunotherapy. Immunotherapy. 2016 ; 8 : 461–77.

[60] Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J et al. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. J Infect Dis. 2010 ; 202 : 202–13.

[61] Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Friling A, Grosse-Wilde H et al. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. Immunology. 2003 ; 109 : 487–95.

[62] Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vicenzo P, Giuberti T et al. Characterization of Hepatitis B virus-Specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. J Virol. 2007 ; 81 : 4215–25.

[63] Riordan SM, Skinner N, Kurtovic J, Locarnini S et Visvanathan K. Reduced expression of toll-like receptor 2 on peripheral monocytes in patients with chronic Hepatitis. Reduced expression of toll-like receptor 2 on peripheral monocytes in patients with chronic Hepatitis B. Clin Vaccine Immunol. 2006 ; 13 : 972–4.

[64] Li Y, Wang J-J, Gao S, Liu Q, Bai J, Zhao X-Q et al. Decreased peripheral natural killer cells activity in the immune activated stage of chronic hepatitis B. PLoS One. 2014 ; 9 : 1–8.

[65] Bedossa P. La fibrose au cours de l' hépatite B : un processus dynamique. Gastroentérologie Clin Biol. 2010 ; 34 : 103–8.

[66] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the Liver. Physiol Rev. 2008 ; 88 : 125–72.

[67] Liaw Y-F, Lin D-Y, Chen T-J, et Chu C-M. Natural course after the development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. Liver. 2008 ; 9 : 235–41.

[68] Di Bisceglie AM. Hepatitis B and hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2009 ; 49 : 56–60.

[69] Chaturvedi VK, Singh A, Dubey SK, Hetta HF, John J et Singh MP. Molecular mechanistic insight of hepatitis B virus mediated hepatocellular carcinoma. Microb Pathog. 2019 ; 128 : 184–94.

[70] Xia Y et Protzer U. Control of Hepatitis B Virus by Cytokines. Viruses. 2017 ; 9 : 1-12.

[71] Pawlotsky J-M. Les techniques virologiques de diagnostic et de suivi de l'hépatite B. Gastroentérologie Clin Biol. 2008 ; 32 : 56–63.

[72] Valla DC. Cholestase. Hepato-Gastro. 2013 ; 20 : 618–27.

[73] Desbene C et Gaillard O. Caractéristiques immuno-analytiques de l'alpha fœtoprotéine. Immuno-Analyse Biol Spec. 2013 ; 28 : 158–65.

[74] Zeitoun J-D, Chryssostalis A et Lefevre J. Cirrhose non compliquée. Dans : Vernazobres-Grego (ed) Hépatologie Gastro-entérologie Chirurgie viscérale. 2020, 406–18.

[75] Zeitoun J-D, Chryssostalis A, Lefevre J. Hépatites virales. Dans : Vernazobres-Grego (ed) Hépatologie Gastro-entérologie Chirurgie viscérale. Paris, 2020, 303–326.

[76] Paccoud O, Surgers L et Lacombe K. Hepatitis B virus infection: Natural history, clinical manifestations and therapeutic approach. Rev Med Interne . 2019 ; 40 : 590–8.

[77] Martinot-Peignoux M, Boyer N, Colombat M, Akremi R, Pham B-N, Olivier S et al. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. J Hepatol. 2002 ; 36 : 543–6.

[78] Yang R, Song G, Guan W, Wang Q, Liu Y, et Wei L. The Lumipulse G HBsAg-Quant assay for screening and quantification of the hepatitis B surface antigen. J Virol Methods. 2016 ; 228 : 39–47.

[79] McMahon BJ, Alward WLM, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. J Infect Dis. 1985 ; 151 : 599–603.

[80] Lefevre J, Zeitoun J-D et Chryssostalis A. Les tumeurs primitives et secondaires du foie. Dans : Vernazobres-Grego (ed) Hépatologie Gastro-entérologie Chirurgie viscérale. Paris, 2020, 450–72.

[81] Abbas KA, Andrew HL et Shiv P. Capture des antigènes et présentation aux lymphocytes: Ce que voient les lymphocytes. Dans: Elsevier Masson (ed) Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. 2020, 46–64.

[82] Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. Tissue Antigens. 2010 ; 75: 291–455.

[83] National Library of Medicine. rs3077 RefSNP Report [Internet]. Bethesda :

NCBI ; publié le 21 septembre 2022 (Consulté le 13 janvier 2023). Disponible à partir de : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3077.

[84] Koukoulioti E, Fischer J, Schott E, Fülöp B, Heyne R, Berg T et al. Association of HLA-DPA1 and HLA-DPB1 polymorphisms with spontaneous Hbs Ag seroclearance in Caucasians. Liver Int. 2019 ; 39 : 646–54.

[85] Thakkinstian A, McElduff P, D'Este C, Duffy D et Attia J. A method for meta-analysis of molecular association studies. Stat Med. 2005 ; 24 : 1291–306.

[86] Lwanga SK et Lemeshow S. Determination de la taille d'un échantillon dans les études sanometriques. 1st ed. Genève: Organisation mondiale de la Santé, 1991.

[87] Chomczynski P et Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 ; 162 : 156–9.

[88] Ifremer. Principe de l'amplification par PCR. PubMed. 2009 ; 1–4.

[89] Mathys V, Lefèvre P, Fontaine V, Dehem M, Donnio PY, Février F et al. La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. Antibiotiques. 2007 ; 9 : 205–11.

[90] Malkki M et Petersdorf EW. Genotyping of single nucleotide polymorphisms by 5′ nuclease allelic discrimination. Dans : Walker JM (ed) Methods in molecular biology. Humana Pres Inc.173–82.

[91] Bio-techne. Luminex assay users guide : a clear and easy guide to luminex multiplex immunoassays. 2019; 1–80.

[92] Kpossou A., Gnangnon FHR, Seidou F, Hounsa CTM, Adjadohoun S, Vignon RK et al. Aspects épidémiologiques, cliniques, paracliniques et

thérapeutiques du carcinome hépatocellulaire à Cotonou. Med Afr Noire. 2020 ; 67 : 537–45.

[93] Sehonou J, Cossou Gbeto C, Dodo LSR, Wolo BA, Agbodande KA, Azon-Kouanou A et al. Cirrhose hépatique dans le service de médecine interne du CNHU de Cotonou (2011-2014) : aspects épidémiologiques, cliniques et évolutifs. J la Société Biol Clin du Bénin. 2019 ; 36–41.

[94] Dovonou CA, Amidou SA, Kpangon AA, Traoré YA, Martial TP, Satondji AJ et al. Prévalence de l'hépatite B chez les personnes infectées par le VIH à Parakou au Bénin. Pan Afr Med J. 2015 ; 20 : 1–6.

[95] Sawadogo A, Ouédraogo AS, Poda A, Dahourou H, Pivert A, Mansour W et al. Séroprévalence de l'infection par le virus de l'hépatite D dans une population de donneurs de sang porteurs de l'Antigène HBs au Centre régional de transfusion sanguine de Bobo-Dioulasso. J Africain d'Hépato-Gastroentérologie. 2016 ; 10 : 31–3.

[96] Kpossou AR, Zomahoun AMO, Sogbo F, Vignon RK, Sokpon CNM, Sehonou J et al. Influence de l'infection par le virus de l'hépatite D sur le profil évolutif de l'infection par le virus de l'hépatite B à Cotonou. Med Afr noire (En ligne). 2019 ; 493–8.

[97] Toumin C, Kaba I, Camara M, Iv B, Konan M, et Toutou T. Aspects Cliniques et Paracliniques de l ' Hépatite Virale B Chronique au CHU de Treichville Clinical and paraclinical features of chronic hepatitis B virus at the CHU of Treichville. Heal Sci Dis. 2021 ; 22 : 16–9.

[98] Thomas R, Thio CL, Apps R, Qi Y, Gao X, Marti D et al. A Novel Variant Marking HLA-DP Expression Levels Predicts Recovery from Hepatitis B Virus Infection. J Virol. 2012 ; 86 : 6979–85.

[99] Trinks J, Nishida N, Hulaniuk ML, Caputo M, Tsuchiura T, Marciano S et al. Role of HLA-DP and HLA-DQ on the clearance of hepatitis B virus and

the risk of chronic infection in a multiethnic population. Liver Int. 2017 ; 37 : 1476–87.

[100] Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. Nat Genet. 2009 ; 41 : 591–5.

[101] Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M , Ahn SH, Park JY et al. Genome-Wide Association Study Confirming Association of HLA-DP with Protection against Chronic Hepatitis B and Viral Clearance in Japanese and Korean. PLoS One. 2012 ; 7: 1–8.

[102] Wong DK-H, Watanabe T, Tanaka Y, Seto W-K, Lee C-K, Fung J et al. Role of HLA-DP Polymorphisms on Chronicity and Disease Activity of Hepatitis B Infection in Southern Chinese. PLoS One. 2013 ; 8 : 1–5.

[103] Song Y, Xia T, Xia X, et Zhang AM. Genetic polymorphisms of the HLA-DP and HLA-DQ genes could influence Hepatitis B virus infection in Yunnan population. Immunol Invest. 2021 ; 50 : 47–57.

[104] Akgöllü E, Bilgin R, Akkız H, Ülger Y, Kaya BY, Karaoğullarından Ü et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and HLA-DP gene polymorphisms in the Turkish population. Virus Res. 2017 ; 232 : 6–12.

Annexes

Annexe 1 : Fiche de collecte des données cliniques et paracliniques des sujets du groupe cas

Numéro d'identification : ……..

Q	Item	Propositions	Réponse	Observations
		I- Renseignements généraux		
Q1	Âge			
Q2	Sexe			
Q3	Ethnie			
Q4	Adresse			
		II- Facteurs de risque de maladie hépatique		
Q5	Alcool	1. Oui 2. Non		
Q6	Évaluation de la consommation d'alcool			
Q7	Autres hépatotoxiques	1. Tisanes 2. Autres (A préciser dans la case observation) 3. Aucun		
Q8	Mode de contamination suspecté	1. Vertical 2. Horizontal 3. Sexuel 4. Sanguin 5. Non connu		
Q9	Autres facteurs de risque	1. Condition d'immunodépression 2. Autres (A préciser dans la case « observation ») 3. Aucun		
		III- Co-infections		
Q10	VIH	1. Présent 2. Absent 3. Non disponible		
Q11	VHC			
Q12	VHD			
		IV- Activité virale		

Q13	Antigène Hbe (préciser le titre dans la case observation)	1. Présent 2. Absent 3. Non disponible		
Q14	ADN du VHB (Présent le titre dans la case observation			
	V- Bilan Hépatique (Préciser le titre dans la case « Observation)			
Q15	ASAT (préciser en « n fois la normale » dans la case « observation »)	1. Normal 2. Elevé 3. Non disponible		
Q16	ALAT (préciser en « n fois la normale » dans la case « observation »)			
Q17	Gamma-Glutamyl transférase			
Q18	Phosphatases alcalines			
Q19	Bilirubine totale			
Q20	Bilirubine Conjuguée			
Q21	Bilirubine libre			
Q22	Albuminémie	1. Normal 2. Bas 3. Non disponible		
	VI- Numération formule sanguine			
Q23				
	VII- Bilan de coagulation			
Q24	Taux de prothrombine	1. Normal 2. Abaissé 3. Non disponible		
	VIII- Marqueur tumoral			
Q25	Alpha fœto-protéïne	1. Elevé 2. Normal		
	IX- Évaluation de l'atteinte hépatique au Fibroscan			
Q26	Niveau de fibrose	1. Pas de fibrose 2. Fibrose peu significative 3. Fibrose modérée ou sévère 4. Cirrhose		

		X- Phase de l'infection par le VHB		
Q27	A quelle phase d'infection par le VHB se trouve le patient ?	1. Infection chronique AgHbe + 2. Hépatite chronique AgHbe + 3. Infection chronique AgHbe - 4. Hépatite chronique AgHbe - 5. Hépatite b occulte		
		XI- Atteinte hépatique		
Q28	Quelle atteinte hépatique présente le patient ?	1. Fibrose (Peu significative, sévère) 2. Cirrhose 3. Carcinome hépato-cellulaire		
		XII- Génotype RS 3077		
Q29	**Quel est le génotype présenté par le patient sur le locus chr6 :33065245**	**1. AA** **2. AG** **3. GG**		

Annexe 2 : Note d'information à l'attention des sujets du groupe cas

Note explicative à l'attention des participants

Thème de l'étude : « Facteurs de risque de chronicisation d'une infection par le virus de l'hépatite B et effet du polymorphisme du gène HLA-DPA1 (Rs3077) au sud Bénin ».

Pourquoi avez-vous été sélectionné ?

Vous avez été sélectionné pour participer à cette étude parce-que vous êtes porteur chronique du virus de l'hépatite B.

En quoi consiste cette étude ?

Ce travail vise globalement à identifier les facteurs de risques de passage à la chronicité d'une infection par le virus de l'hépatite B présentés par le participant puis à déterminer si ce dernier est porteur de la variation rs3077.

Qu'implique ma participation à ce travail ?

Pour se faire, nous aurons besoin :

- De recueillir lors d'un entretien avec le participant les données relatives à son identité (Nom, Prénoms, âge, sexe, ethnie, adresse) ainsi qu'à certains facteurs de risque de maladie hépatique (Prise d'alcool ou d'autre hépatotoxique et mode de contamination si possible)
- D'accéder au dossier médical du participant afin d'y recueillir les résultats du bilan récent (moins de 3 mois). Ceci nous permettra de statuer sur le stade évolutif de l'infection par le virus de l'hépatite B ainsi que sur le degré d'atteinte hépatique.
- De prélever un échantillon sanguin qui sera analysé au laboratoire à la recherche de la variation rs3077

Il y a-t-il des risques ou des inconvénients à ma participation ?

Douleur lors du prélèvement sanguin.

Quel usage sera fait des données recueillies et des résultats d'analyse ?

Au terme de cette étude les résultats feront l'objet d'une thèse qui sera soutenue à la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou. Ces résultats pourraient également faire l'objet de publications scientifiques.

Néanmoins les informations sur l'identité des participants ne seront en aucun cas divulguées.

Un numéro d'identification sera attribué à la fiche sur laquelle les données seront recueillies. Le même numéro figurera sur le tube apprêté pour contenir l'échantillon sanguin.

NB : Pour plus d'informations, vous pouvez contacter le +22955928847 ou envoyer un mail à l'adresse cer_isba@yahoo.fr

Comité d'Ethique de la Recherche de l'ISBA
Le Président

Annexe 3 : Note d'information à l'attention des sujets du groupe témoin

Note d'information à l'attention des participants (Témoins)

Thème de l'étude : « Facteurs de risque de chronicisation d'une infection par le virus de l'hépatite B et effet du polymorphisme du gène HLA-DPA1 (Rs3077) au sud Bénin ».

Pourquoi avez-vous été sélectionné ?

Vous avez été sélectionné pour participer à cette étude parce-que vous n'êtes pas porteur du virus de l'hépatite B.

En quoi consiste cette étude ?

Ce travail vise globalement à identifier un lien entre la mutation génétique Rs 3077 et le portage chronique du virus de l'hépatite B.

Pour cela nous avons recherché cette mutation génétique chez des sujets porteurs du virus de l'hépatite B.

Nous voulons à présent comparer la fréquence de cette mutation à celle dans une population de sujets non porteurs du virus de l'hépatite B. Population dont vous faites partie

Qu'implique ma participation à ce travail ?

Pour se faire, nous aurons besoin :

- De recueillir des informations relatives à votre identité (Age, sexe, ethnie, adresse)
- De prélever un échantillon sanguin qui sera analysé au laboratoire de biologie humaine de l'Institut des sciences biomédicales appliquées du Bénin (ISBA) à la recherche de la variation rs3077

Il y a-t-il des risques ou des inconvénients à ma participation ?

Non, car le recueil de l'échantillon sanguin ne demandera pas un prélèvement supplémentaire à celui qui vous sera fait au cours de votre don de sang.

Quel usage sera fait des données recueillies et des résultats d'analyse ?

Au terme de cette étude les résultats feront l'objet d'une thèse qui sera soutenue à la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou. Ces résultats pourraient également faire l'objet de publications scientifiques.

Néanmoins les informations sur l'identité des participants ne seront en aucun cas divulguées.

Un numéro d'identification sera attribué au tube apprêté pour contenir l'échantillon sanguin.

NB : Pour plus d'informations, vous pouvez contacter le +22955928847 ou envoyer un mail à l'adresse cer_isba@yahoo.fr



Annexe 4 : Fiche de consentement

FICHE DE CONSENTEMENT

Facteurs de risque de chronicisation d'une infection par le VHB et effet du polymorphisme du HLA-DPA1 (rs3077) au sud Bénin

Directeur de thèse : Professeur SEHONOU Jean, Professeur Titulaire d'Hépato-gastoentérologie, Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences de Santé.

Engagement du (de la) participant(e)

Je soussigné(e), ...

déclare avoir lu et compris le contenu du présent formulaire.

Je certifie avoir discuté avec le chercheur et compris l'objectif, la modalité de participation, les avantages, les risques et les inconvénients de l'étude en question.

J'ai eu l'occasion de poser des questions concernant cette étude et le chercheur y a répondu à ma satisfaction.

Après réflexion et un délai raisonnable, je consens librement à prendre part à cette étude. Je sais que je peux me retirer en tout temps sans préjudice.

Signature du participant..... Date.....

Engagement du chercheur :

Je soussigné ..... Certifie :

a) avoir expliqué au participant les termes du présent formulaire de consentement;

b) lui avoir clairement indiqué que sa participation est libre et volontaire et que je lui remettrai une copie signée du présent formulaire.

Je m'engage à respecter la confidentialité et tout ce qui a été convenu dans le formulaire de consentement.

Signature du chercheur..... Date.....



Annexe 5 : Avis éthique favorable du CER-ISBA

RÉPUBLIQUE DU BÉNIN

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

INSTITUT DES SCIENCES BIOMÉDICALES APPLIQUÉES

I. S. B. A.

Comité d'Ethique de la Recherche
CER-ISBA

DECISION ETHIQUE FAVORABLE

N°151 du 03/08/2022

LE PRESIDENT

A

Monsieur LALEYE Maurel Xavier Abodunrin et Collaborateurs

Monsieur,

Votre protocole de recherche intitulé « **Facteurs de risque de chronicisation d'une infection par le virus de l'hépatite B et effet du polymorphisme du gène HLA-DPA1 (Rs3077) au sud Bénin** » a été évalué par le Comité d'Ethique de la Recherche de l'ISBA composé des membres suivants :

- DRAMANE Karim
- LOKO Fréderic
- KEDOTE Marius
- GBANKOTO B. Adam
- NAHUM Alain
- de SOUZA Léchidia Pélagie
- TOFFOUN QUENUM Marie Marc
- DOSSOU-YOVO Bonaventure
- SOSSOU AGBOHOLOU Françoise
- OUINSOU S. Edmond
- AKOHA B. Théophile

Sur la base de :

1. documents suivants soumis le 13 juillet 2022 :
   - protocole de recherche ;
   - budget de recherche ;
   - chronogramme détaillé ;
   - note d'information ;
   - formulaire de consentement ;
   - outils de collecte de données ;
   - CVs des chercheurs principaux ;

2. de vos réponses aux commentaires du comité sur votre dossier et de la nouvelle version du formulaire de soumission et le protocole soumis le 02 août 2022 ;

1/2

01 B.P. Tél.: 21 30 55 65 E-mail : isba@intnet.bj COTONOU (République du Bénin)
Site Web : www.isbabenin.com

le comité d'éthique de la recherche de l'ISBA a évalué les aspects scientifiques et éthiques conformément aux normes nationales en vigueur.

Par conséquent, le CER-ISBA vous accorde **sa décision favorable** pour la mise en œuvre de la recherche au Bénin.

Cette décision est valable pour une période d'un (01) an à compter de sa date de signature.

Par ailleurs, le CER-ISBA vous demande de :

1) L'informer de toute nouvelle information / modification, qui surviendrait à une date ultérieure à cette approbation-ci et qui impliquerait des changements dans le choix des sujets, dans la manière d'obtenir leur consentement, les risques encourus survenant dans le cadre du déroulement de cette recherche. Le CER-ISBA doit, en effet, dans ces cas, réévaluer et donner une nouvelle approbation avant l'entrée en vigueur desdites modifications ;
2) Utiliser les documents qu'il a validé (protocole, **note d'information et formulaires de consentement tamponnés par le CER-ISBA**, etc.) ;
3) Conserver dans vos dossiers, les versions originales des formulaires de consentement signés par les participants de recherche ou leurs témoins ;
4) Lui adresser **un rapport annuel** de la recherche.

Tout en vous souhaitant pleins succès pour la réalisation de votre recherche, le CER-ISBA vous remercie pour la confiance à lui accordée.

Cotonou, le 03 août 2022

Le Président

Prof. Karim DRAMANE

Comité d'Ethique de la Recherche de l'ISBA • Le Président

2/2

Annexe 6 : Autorisation de collecte de donnée au service d'hépato-gastro-entérologie du CNHU-HKM

REPUBLIQUE DU BENIN – MINISTERE DE LA SANTE
CENTRE NATIONAL HOSPITALIER UNIVERSITAIRE HUBERT K. MAGA
Direction Générale

01 BP : 386
(+229) 21 30 06 56
www.cnhu-hkm.org

CELLULE DE LA STATISTIQUE MEDICALE ET DE LA RECHERCHE

Cotonou, le 31 AOUT 2022

NOTE DE SERVICE

N°1445/MS/CNHU-HKM/DAF/CSMR

Objet : Autorisation de collecte

Références : - Bordereau N°090/MS/CNHU-HKM/CSMR en date du 22 Juillet 2022 ;
- Demande de monsieur LALEYE M.X. Abodunrin en date du 20 juillet 2022 ;
- Demande du Directeur de Thèse et Chef CUHGE Prof SEHONOU Jean en date du 19 juillet 2022.

Dans le cadre de sa thèse de Doctorat d'Etat en Médecine, portant sur le thème « **Facteurs de risque de chronicisation de l'infection par le virus de l'hépatite B et effet du polymorphisme du HLA-DPA1 (rs3077) au sud du Bénin** », Monsieur **LALEYE Maurel Xavier Abodunrin**, étudiant en septième année de Médecine Générale à la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou, est autorisé à effectuer une collecte de données, à la **Clinique Universitaire d'Hépato-Gastroentérologie** du Centre National Hospitalier Universitaire Hubert K. MAGA.

A cet effet, le Chef Clinique et ses Surveillants sont priés de tout mettre en œuvre pour faciliter à l'intéressé, l'accès aux sources de données.

Ladite collecte se fera sous l'encadrement du chef Cellule de la Statistique Médicale et de la Recherche.

A la fin de l'étude, l'intéressé devra transmettre à la Direction Générale du CNHU-HKM, les versions électroniques du rapport d'étude et de la base de données recueillies, par mail, à l'adresse suivante : « csmr.cnhuhkm@gmail.com ».

La présente note de service est valable à compter du **05 Septembre au 11 Novembre 2022.**

NB : Les dossiers médicaux et les registres doivent être consultés sur place. La confidentialité des données collectées est requise.

Ampliations :
- DAF, C/SRH, P/CME, C/CSRM
- C/CUHGE, Surveillants,
- Intéressé, Archives, Chrono

Le Directeur Général,

CENTRE NATIONAL HOSPITALIER UNIVERSITAIRE H K M
Le Directeur Général

Prof. Dieu donné GNONLONFOUN

Annexe 7 : Autorisation de réalisation d'étude à l'AD Atlantique-littoral de l'ANTS

MINISTÈRE DE LA SANTÉ
RÉPUBLIQUE DU BENIN

Adresse postale : 01 BP 511 Cotonou
Telephone : 21 32 04 38
Email : antsbenin@yahoo.fr
Site web : www.sante.gouv.bj
www.antsbenin.org

SECRETARIAT GENERAL DU MINISTERE
AGENCE NATIONALE POUR LA TRANSFUSION SANGUINE (ANTS)

N°1382/MS/ANTS/DG/DAF/DPACH/SAQHHR/SA Cotonou, le 24 OCT 2022

NOTE DE SERVICE

Objet : Autorisation de réalisation d'étude.

Références : Correspondance N°033/MS/CNHU-HKM/CU-HGE/CED du 19/07/2022.

Dans le cadre de sa thèse d'Etat en médecine portant sur le thème « Facteurs de risque de chronicisation de l'infection par le virus de l'hépatite B et effet du polymorphisme du HLA-DPA1 (rs3077) au sud Bénin », ***Monsieur LALAYE Maurel Xavier Aboudunrin, étudiant en 7ème année de Médecine Générale à la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou***, est autorisé à effectuer des collectes de données auprès des donneurs de sang au Service de Transfusion Sanguine du Littoral sis au CNHU-HKM de Cotonou.

A cet effet, le Chef Service Transfusion Sanguine du Littoral et ses collaborateurs, sont priés de faciliter à l'intéressé la réalisation de son étude sur les donneurs testés AgHBs négatifs.

L'intéressé devra prendre des dispositions pour assurer la confidentialité des informations personnelles des sujets recrutés et transmettre à la fin de l'étude, le rapport de son étude à la Direction Générale de l'ANTS.

La présente note de service est valable du 21 octobre au 31 décembre 2022.

MINISTERE DE LA SANTE • ANTS • Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine
Le Directeur Général

Dr Orou Badou YOROU CHABI
Directeur Général

Annexe 8 : Matériel utilisé

- **Consommables**
  - ✓ Fiche de collecte, note d'information, Fiche de consentement
  - ✓ Stylos
  - ✓ Marqueurs
  - ✓ Kit de prélèvement (Gants, coton, alcool, garrot, aiguilles, corps vacutainer, tube EDTA, sparadrap)
  - ✓ Cône de 0,1 - 10 µl avec filtre, stérile en rack
  - ✓ Cône 100-1000 µl avec filtre, stérile en rack
  - ✓ Cône 2-200 µl avec filtre, stérile en rack
  - ✓ Cône 1-100 µl avec filtre, stérile en rack
  - ✓ Tube eppendorf de 1,5 ml
  - ✓ Éthanol (Éthanol absolu, Éthanol à 70°C)
  - ✓ Chlorure de sodium
  - ✓ Chloroforme
  - ✓ Alcool Isoamilique
  - ✓ Urée
  - ✓ Tris HCL
  - ✓ SDS
  - ✓ Acide borique
  - ✓ Phénol cristallisé

- ✓ Eau distillée

- **Équipement**

  - ✓ Réfrigérateur
  - ✓ Micropipette réglable de 1 à10 microlitres
  - ✓ Micropipette réglable de 20 microlitres
  - ✓ Micropipette réglable de 50 microlitres
  - ✓ Micropipette réglable de 100 microlitres
  - ✓ Micropipette réglable de 1000 microlitres
  - ✓ Centrifugeuse
  - ✓ Mélangeur rotatif
  - ✓ Agitateur à vortex
  - ✓ Agitateur orbital pour microplaque
  - ✓ Laveur magnétique de plaque
  - ✓ Bain-marie
  - ✓ Hotte à flux laminaire
  - ✓ Thermocycleur
  - ✓ Instrument luminex MAGPIX™

Annexe 9 : Étapes de l'extraction d'ADN par méthode phénol-chloroforme

- **Préparation des réactifs pour l'extraction**

  - ✓ Tampon de lavage : T10E1

Pour 1 litre de T10E1, mélanger 10 millilitres de Tris HCL à 1 molaire et 2 ml d'EDTA à 0.5 molaire. Puis diluer le tout avec 88 millilitres d'eau distillée.

  - ✓ Tampon T10E0,1

Réalisé par dilution au 10^{e} du tampon T10E1

  - ✓ Tampon d'homogénéisation

Pour préparer 200ml de tampon, dissoudre 96.096 g d'urée, 3.506 g de Chlorure de sodium et 4 g de dodécylsulfate de sodium dans 200 ml de tampon T10E1.

  - ✓ Mélange phénol-chloroforme isoamylique

Réaliser le mélange dans des proportions de 1 ml d'alcool isoamylique, 24 ml de chloroforme et 25 ml de phénol, ceci pour un volume total de 50 ml

- **Extraction proprement dite**

  - ✓ Conditionnement des échantillons : Prélever 500 à 750 microlitres de sang total dans un tube Eppendorf de 1,5 ml .
  - ✓ Fragilisation des membranes cellulaires par choc thermique : Mettre les tubes à -20°C pendant 5 minutes puis au bain-marie pendant 3 minutes.
  - ✓ Lavage au T10E1
    - Commencer le lavage en remplissant le tube avec du T10E1.
    - Après une brève homogénéisation, centrifuger à 16000 tours par minute pendant 10 minutes.

- Décanter le surnageant.
- Répéter le lavage au T10E1 jusqu'à ce que le culot de centrifugation soit clair.

✓ Digestion

- Ajouter au culot de centrifugation 600 microlitres de tampon d'homogénéisation et laisser au bain-marie à 37°C pendant au moins une heure.
- Homogénéiser à la sortie du bain-marie en s'assurant que le culot cellulaire a été bien digéré.

✓ Séparation de phase

- Ajouter 400 microlites de Phénol-chloroforme isoamylique sous une Hotte.
- Homogénéiser le tout pendant 25 minutes au mélangeur.
- Centrifuger à 9000 tours par minute pendant 10 minutes en prenant soin de réduire la vitesse de décélération.
- On obtient deux phases. Une aqueuse supérieure et une deuxième protéique inférieure. L'ADN se trouve dans la phase aqueuse.

✓ Précipitation de l'ADN

- Prélever la phase aqueuse supérieure en veillant à ne pas prendre l'interface et la mettre dans un tube nouvellement apprêté et étiqueté.
- Ajouter à cette phase aqueuse décantée, 3 fois son volume en éthanol absolu refroidit.

- ADN contenu dans la phase aqueuse précipite sous la forme d'un filament blanchâtre.

✓ Purification de l'ADN

- Laisser le filament se déposer au fond du tube puis centrifuger à 16000 tours par minutes pendant 10 minutes afin qu'il s'accole à la paroi du tube.
- Purifier deux fois le filament avec de l'éthanol 70% et laisser sécher.

✓ Mise en solution de l'ADN et dilutions

- Remettre en solution l'ADN séché dans les tubes Eppendorf avec 200 microlitres du tampon T10E0.1.
- Doser l'ADN à l'aide d'un spectromètre de masse.
- Une fois les concentrations notées, réaliser les dilutions avec du T10E0,1 de manière à obtenir des concentrations comprises entre 5 et 25 nanogrammes/millilitre.

Annexe 10 : Réactifs pour réalisation de la PCR

- **Amorces et sondes de fluorescence**

	Séquence (5'à 3')
Amorce sens	TCAGCTTTTCTTCTCACTTCATGTG
Amorce anti-sens	AGCTTGAAGGGTCAGCAATTC
Sonde T (HEX)	HEX-AAACTACTCCAGTGGCT-EDQ
Sonde C (FAM)	FAM- AAACTACCCCAGTGGC-EDQ

- **MasterMix Taqman 2x: Taqman™ Fast universal PCR master mix (2x) No amperase UNG; lot 00730474 by Applied Biosystems**

Annexe 11 : Référence du kit de dosage de cytokines et étapes de préparation des réactifs

ProcartaPlex Human Cytokine Storm Panel 21-plex	
N° Catalogue	EPX210-15850-901
Numéro de lot	338280-002
Numéro de lot du mix standard	319076-000, 315392-000, 317739-000
Analytes	G-CSF (CSF-3), GM-CSF, IFN α, IFN ɣ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL12p70, IL-13, IL-17A (CTLA-8), IL-18, IP-10 (CXCL10), MCP-1(CCL2), MIP-1 α(CCL3), MIP-1 β(CCL4), TNF α, TNFβ

- **Préparation des réactifs**

  - ✓ Tampon de lavage

Amener le concentré de tampon de lavage (10X) à température ambiante et vortexer pendant 15 secondes. Mélanger 20 ml de concentré de tampon de lavage (10X) avec 180 ml d'eau deux fois diluée. Mélanger délicatement pour éviter la mousse.

  - ✓ Préparation du mélange standard

    - Centrifuger le flacon de mélange standard à 2000 tours/minute pendant 10 secondes.
    - Ajouter 250 µL de diluant au flacon de réserve.

- Vortexer le flacon à grande vitesse pendant 30 secondes et centrifugez à 2000 tours/minute pendant 10 secondes pour recueillir le contenu au fond du flacon.
- Incuber sur de la glace pendant 10 minutes pour assurer une reconstitution complète.

✓ Préparation des dilutions du mélange standard

- Étiqueter les tubes de la barrette de 8 tubes : Std1, Std2, Std3, Std4, Std5, Std6 et Std7.
- Ajouter 200 µL du mélange standard reconstitué dans le tube St d1.
- Ajouter 150 µL de diluant dans les tubes Std2–Std7.
- Transférer 50 µL du tube Std1 dans le tube Std2.
- Mélanger en pipettant de haut en bas 10 fois.
- Transférer 50 µL des étalons mixtes du tube Std2 dans le tube Std3 en utilisant une nouvelle pointe de pipette.
- Mélanger en pipettant de haut en bas 10 fois.
- Répéter les étapes 4 à 7 pour les tubes Std4-Std, en changeant les embouts de pipette entre les étapes de dilution.
- Ajouter 150 µL de diluant au dernier tube de la barrette de 8 tub es pour servir de fond.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES

Liste des enseignants ii

Action de grâce viii

Dédicaces x

Remerciements xiii

Hommages xvi

Liste des abréviations et des sigles xix

Liste des tableaux xxiii

Liste des figures 25

Sommaire xxviii

Introduction 1

1- Généralités 5

1-1- Définitions 6

1-2- Anatomie du foie 7

1-2-1. Anatomie macroscopique [15] 7

1-2-2. Anatomie microscopique [17, 18] 10

1-2-3. Fonctions du foie 11

1-3- Virus de l'hépatite B 11

1-3-1. Structure 11

1-3-2. Réplication virale 15

1-3-3. Épidémiologie 19

1-3-3.1. Prévalence du VHB 19

1-3-3.2. Transmission du VHB 20

1-3-3.3. Prévention 21

1-3-4. Immunologie et immunopathogenèse 22

1-3-4.1. Hépatite aigüe 22

Hépatite fulminante 24

1-3-4.2. Le portage chronique 24

La fibrose hépatique 26

Carcinome hépatocellulaire (CHC) 27

1-3-5. Les cytokines intervenant dans l'infection par le VHB 27

1-3-6. Les outils de diagnostic et de suivi 28

1-3-6.1. La biologie 28

1-3-6.2. Les outils de morphologie [74] 31

1-3-6.3. Méthodes non invasives d'évaluation de la fibrose 32

1-3-7. Histoire naturelle de l'infection par le VHB 34

1-3-7.1. Hépatite aigüe 34

1-3-7.2. Le portage chronique 34

1-3-8. Diagnostic positif d'une infection au VHB 36

1-3-8.1. Hépatite aigüe 36

1-3-8.2. Portage chronique 37

1-3-8.3 Diagnostic positif des principales complications de l'infection au VHB 37

1-4- Le complexe majeur d'histocompatibilité 40

1-4-1. Structure et fonction des protéines du CMH [81] 40

1-4-1.1. Les protéines du CMH de classe I 40

1-4-1.2. Les protéines du CMH de classe II 41

1-4-1.3. Apprêtement et présentation des antigènes 42

1-4-2. Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité 43

1-4-3. Polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité et association avec le virus de l'hépatite B 45

1-4-4. Particularité des études d'association génomique [85] 46

2- Cadre et méthodes d'étude 48

2-1- Cadre d'étude 49

2-1-1. La Clinique Universitaire d'Hépato-Gastro-Entérologie du CNHU-HKM……..... 49

2-1-2. L'antenne départementale Atlantique-Littoral de l'ANTS 50

2-1-3. Le laboratoire de cytogénétique et de biologie moléculaire (Unité de Biologie Humaine) de la FSS 51

2-1-4. L'Institut de microbiologie, d'immunologie et de parasitologie de la clinique universitaire de Bonn 52

2-2- Méthode d'étude 52

2-2-1. Type d'étude 52

2-2-2. Période d'étude 52

2-2-3. Population d'étude 52

2-2-3.1. Critères d'inclusion 52

2-2-3.2. Critères de non-inclusion 53

2-2-4. Echantillonnage 53

2-2-5. Variables 54

2-2-6. Aspects opérationnels des variables 55

2-2-7. Déroulement de l'étude 58

2-2-7.1. Le recrutement des sujets du groupe cas 58

2-2-7.2. Le recrutement des sujets du groupe témoin 59

2-2-7.3. Acheminement des prélèvements au laboratoire de cytogénétique et de biologie moléculaire (Unité de Biologie Humaine) de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou 59

2-2-7.4. Centrifugation des échantillons du groupe cas 59

2-2-7.5. Extraction d'ADN par méthode phénol chloroforme 60

2-2-7.6. Recherche des allèles du gène rs3077 60

2-2-7.7. Dosage de cytokines par la technique luminex® Xmap 65

2-2-8. Analyse statistique des données 69

2-2-9. Considérations éthiques 71

3- Résultats 73

3-1- Caractéristiques sociodémographiques des sujets du groupe cas 74

3-1-1. Âge 74

3-1-2. Sexe 74

3-1-3. Ethnie 75

3-1-4. Ville de résidence 75

3-2- Consommation d'alcool chez les porteurs chroniques du VHB 76

3-3- Autres potentiels hépatotoxiques 76

3-4- Autres pathologies chroniques 76

3-5- Co-infections 76

3-6- Étape de l'histoire naturelle 77

3-7- Évaluation de la fibrose hépatique chez les porteurs chroniques du VHB…… 77

3-8- Carcinome hépatocellulaire chez les porteurs chroniques du VHB 78

3-9- Production de cytokines 78

3-10- Génotype 80

3-10-1. Groupe cas 80

3-10-2. Groupe témoin 81

3-11- Analyse du lien entre portage chronique du VHB et le gène rs3077 .. 81

3-11-1. Évaluation du lien entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 indépendamment du mode de transmission des allèles 81

3-11-2. Lien entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 selon un modèle dominant 82

3-11-3. Lien entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 selon un modèle récessif 83

3-11-4. Lien entre le portage chronique du VHB et le gène rs3077 selon un modèle codominant 83

3-11-5. Analyse du lien entre la production de cytokines et le génotype présenté au sein du groupe cas 84

4- Discussion 86

4-1- Intérêt de l'étude 87

4-2- Limites de l'étude 88

4-3- Méthodologie de travail 88

4-3-1. Choix du type d'étude 88

4-3-2. Biais de sélection et d'information 88

4-3-3. Validité de la méthode d'analyse des données 89

4-4- Atteinte des objectifs 90

4-5- Caractéristiques sociodémographiques des porteurs chroniques du VHB…… 91

4-5-1. Âge des porteurs chroniques du VHB 91

4-5-2. Sexe des porteurs chroniques du VHB 91

4-5-3. Ethnie et ville de résidence des porteurs chroniques du VHB 92

4-6- Consommation d'alcool et de tisanes chez les porteurs chroniques du VHB…… 92

4-7- Co-infections et autres maladies chroniques 92

4-8- Évaluation de la fibrose hépatique chez les porteurs chroniques du VHB…… 93

4-9- Carcinome hépatocellulaire chez les porteurs chroniques du VHB 93

4-10- Gène rs3077 et portage chronique du VHB 94

4-10-1. Comparaison avec des populations américaines 94

4-10-2. Comparaison avec des populations asiatiques 94

4-10-3. Comparaison avec des populations européennes 96

4-11- Production de cytokines chez les porteurs chroniques du VHB 97

Conclusion 99

Suggestions 102

Références 104

Annexes A

SERMENT D'HIPPOCRATE

Devant le peuple béninois,

En présence des maitres de cette faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate,

Je promets et je jure d'être fidèle aux droits de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine,

J'interviendrai pour les protéger si elles sont vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance.

Respectueux et reconnaissant envers mes maitres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Je donnerai mes soins à l'indigent et je n'exigerai pas un salaire au-dessus de mon travail,

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs,

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement la vie ni ne provoquerai délibérément la mort,

Je préserverai l'indépendance nécessaire et je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je perfectionnerai mes connaissances pour assurer aux mieux ma mission,

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé si j'y manque.

JE LE JURE !

VU LE PRÉSIDENT DU JURY

VU LE DOYEN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LE RECTEUR DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY – CALAVI

RÉSUMÉ

Introduction : La contribution des prédispositions génétiques en général et du gène rs3077 en particulier n'est pas encore explorée en Afrique subsaharienne malgré que cette partie du monde soit à forte endémicité au VHB. Le variant rs3077 est-il lié au développement d'un portage chronique du VHB ? Existe-t-il des différences de production de cytokines d'un génotype à l'autre du rs3077 chez les porteurs chroniques du VHB ?

Objectif : Étudier les facteurs de risque et les effets du polymorphisme du gène rs3077 dans le portage chronique du VHB à Cotonou

Méthode : Il s'est agi sur une période de 5 mois d'une étude transversale cas-témoin avec une partie descriptive concernant les données cliniques et biologiques des porteurs chroniques du VHB et une autre analytique ayant trait au génotypage rs3077 et au dosage des cytokines. La population « cas » était constituée de 48 sujets mélanodermes, porteurs chroniques du VHB, suivis à la Clinique Universitaire d'hépato-gastro-entérologie du CNHU-HKM. Cette population a été appariée selon l'âge et le sexe à 49 sujets « témoin » recrutés parmi les donneurs de sang à l'AD Atlantique-littoral de l'ANTS (sis au CNHU-HKM) et ayant été testés deux fois négatifs à l'AgHBs au cours de l'année 2022. Les sujets des deux groupes ont été génotypés par PCR avec discrimination allélique par réaction 5' exonucléase. Additionnellement, 28 sujets du groupe cas ont bénéficié du dosage de 21 cytokines par technique luminex® Xmap.

Résultats : L'âge des porteurs chroniques du VHB était de 41,208±12,34 ans et la classe d'âge prédominante était celle allant de 31 à 43 ans avec 33,33% de l'effectif. On retrouvait un sex-ratio de 3 hommes infectés pour une femme avec comme potentiel hépatotoxique consommé, l'alcool (62,5% ; Moyenne 30,625±66,86 g/mois) et les tisanes (66,67%). La principale maladie chronique retrouvée chez ces porteurs du VHB était le diabète de type 2 (8,16%). Aucune co-infection avec le VHC, le VHD ou le VIH n'a été détectée et la majorité des sujets étaient au stade d'infection chronique AgHBe négatif (43,75%). Evaluée selon le score APRI et /ou le fibroscan, la fibrose hépatique était non significative et au stade de cirrhose respectivement chez 60,42 et 8,33% de ces sujets. Indépendamment du mode de transmission, les allèles C et T étaient respectivement facteur de risque (OR 3,345 ; IC95% 1,827 - 6,124) et facteur protecteur (OR 0,3 ; IC95% 0,16-0,55). En tenant compte des modes de transmission possibles, l'allèle T était un facteur protecteur uniquement selon le modèle dominant (OR 0,046 ; IC95% 0,005 - 0,136). Tandis que l'allèle C était un facteur de risque selon les modèles récessif (OR : 47,162 ; IC95% 6,754 - 203,063) et codominant (OR 49,782 ; IC95% 7,218 - 213,609). La comparaison des moyennes et des médianes de concentration des cytokines d'un génotype à l'autre ne reflétait aucune différence statistiquement significative.

Conclusion : Les allèles C et T du gène rs3077 sont respectivement facteur de risque et facteur protecteur vis-à-vis du portage chronique du VHB. Il ne semble y avoir aucune différence dans la production de cytokines d'un génotype à un autre chez les porteurs chroniques du VHB.

Mots clés : Gène, rs3077, allèle, VHB, portage chronique, Cotonou

ABSTRACT

Introduction: The involvement of genetic factors in general and of the rs3077 gene in particular has not yet been explored in sub-Saharan Africa despite the fact that this part of the world is highly endemic for HBV. Is the rs3077 variant linked to the development of chronic HBV carriage? Are there differences in cytokine production between rs3077 genotypes in chronic HBV carriers?

Objective: To study the risk factors and the effects of the rs3077 gene polymorphism in chronic HBV carriage in Cotonou

Method: This was a 5-month cross-sectional case-control study with a descriptive part concerning the clinical and biological data of chronic HBV carriers and an analytical part concerning rs3077 genotyping and cytokine assays. The "case" population consisted of 48 melanoderma subjects, chronic HBV carriers, followed in the hepato-gastroenterology department of the CNHU-HKM. This population was matched by age and sex to 49 "control" subjects recruited among blood donors at the Atlantic-Littoral section of the ANTS (located at the CNHU-HKM) and having been tested negative for HBsAg twice during the year 2022. Subjects in both groups were genotyped by PCR with allelic discrimination by 5' exonuclease reaction. In addition, 28 subjects in the case group were assayed for 21 cytokines using luminex® Xmap technology.

Results: The age of the chronic HBV carriers was 41.208±12.34 years and the predominant age group was 31 to 43 years with 33.33% of the population. There was a sex ratio of 3 infected men to one woman. Alcohol (62.5%; mean 30.625±66.86 g/month) and herbal teas (66.67%) were the main hepatotoxic found. The main chronic disease found in these HBV carriers was type 2 diabetes (8.16%). No co-infection with HCV, HDV or HIV was detected and the majority of the subjects were at the stage of HBeAg negative chronic infection (43.75%). Evaluated by APRI score and/or fibroscan, liver fibrosis was non-significant and at the stage of cirrhosis in 60.42 and 8.33% of these subjects respectively. Independently of the transmission's mode, the C and T alleles were respectively a risk (OR 3.345; CI95% 1.827 - 6.124) and a protective (OR 0.3; CI95% 0.16-0.55) factor. Taking into account possible transmission's modes, T allele was a protective factor only in the dominant model (OR 0.046; CI95% 0.005 - 0.136). Whereas C allele was a risk factor according to both recessive (OR: 47.162; CI95% 6.754 - 203.063) and codominant models (OR 49.782; CI95% 7.218 - 213.609). Comparison of means and medians of cytokine's concentration between genotypes did not reflect any significant difference.

Conclusion: C and T alleles of the rs3077 gene are respectively risk and protective factors for chronic HBV carriage. There appears to be no difference in cytokine production between genotypes in chronic HBV carriers.

Key words: Gene, rs3077, allele, HBV, chronic carriage, Cotonou