

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES  
TECHNOLOGIES DE BAMAKO

Faculté de Pharmacie

Année Universitaire 2016-2017

N° 08

## THESE

*INTERET DE L'EVALUATION DE LA CHARGE  
VIRALE DE L'HEPATITE B CHEZ LES DONNEURS  
DE SANG PORTEUR DE L'AgHBs AU CENTRE  
NATIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE  
DE BAMAKO*

Présentée et Soutenue publiquement le 13/02/2017 devant la  
faculté de pharmacie (FAPH)

Par **M. Karim BENGALY**

Pour l'obtention du grade de **Docteur en Pharmacie (Diplôme d'état)**

### Jury

**PRESIDENT DU JURY :** *Pr Daouda Kassoum MINTA*

**MEMBRE :** *Pr Moussa Tiémoko DIARRA*

**MEMBRE :** *Dr Ibréhima GUINDO*

**CO-DIRECTEUR DE THESE :** *Dr Amadou DIARRA*

**DIRECTEUR DE THESE :** *Pr Bourèma KOURIBA*

*Ce travail a été financé par la Fondation Mérieux Lyon*

**DEDICACES**  
**ET**  
**REMERCIEMENTS**

**DEDICACE :**

Au nom d'ALLAH, le tout Miséricordieux, le très Miséricordieux.

<< Gloire à toi ! Nous n'avons de savoir que ce que tu nous as appris. Certes c'est toi l'Omniscient, le Sage >> Sourate 2, Verset : 32(le saint Coran).

Louange et gloire à Dieu le Tout Puisant qui nous a permis de mener à bien ce travail et que la grâce, le salut, les bénédictions et la paix d'Allah soient accordés au meilleur de ses créatures, notre prophète et sauveur Mohamed ibn Abdoullah ibn Abdelmoutalib, aux membres de sa famille, ses compagnons ainsi que ceux qui le suivent jusqu'au jour du jugement dernier.

Cette thèse est la consécration de plusieurs années d'étude au cours desquelles, désillusion, découragement et succès ont été tour à tour au rendez-vous. Au fil des années, cette impatience s'est émoussée mais la soif de connaissance est demeurée intacte.

## Remerciements :

- A ma famille.

A mon père **Diakalia BENGALY**, si l'opportunité était donnée à chacun de choisir son père alors je crois que je n'aurai mieux choisi que toi. Je suis particulièrement fier et heureux d'être ton fils. Ton courage, ton dévouement, ta loyauté et ta bonté font de toi un père modèle. Tu as cultivé en nous un esprit de partage et de tolérance et de bienfaisance envers les autres. A vrai dire tu n'as ménagé aucun effort pour la réussite scolaire et universitaire de tes enfants. Ce jour est l'aboutissement des fruits de tes efforts et de tes nombreuses prières. Que ce travail un parmi tant d'autres, soit l'un des gages de ma reconnaissance éternelle.

Que Dieu t'accorde de longues années de vie dans la santé et la prospérité afin que tu puisses jouir pleinement des fruits de tes sacrifices.

A ma mère, Mme **BENGALY Ditio COULIBALY**: Ta générosité, ta clairvoyance, ton amour pour tes enfants et ceux d'autrui font de toi une mère exemplaire. Tu as consacré entièrement ton temps à ton foyer et à notre éducation, sans jamais te lasser, sans jamais te plaindre et sans jamais flancher. Chère mère, tu nous as donné ce qu'une mère peut donner de plus précieux à ses enfants : amour, affection, soutien sans faille, conseils et j'en passe... .

Bref aucun mot au monde ne pourrait mieux expliquer mes sentiments de reconnaissance de tes bienfaits. Nous prions le tout puissant afin qu'il t'accorde une longue et heureuse vie pleine de bonheur afin que tu puisses profiter pleinement du fruit de tes sacrifices.

A ma grande mère feu **Saran DEMBELE** :

Femme noire, femme africaine, Chère mamie, c'est le moment pour moi de me prosterner sur ta tombe. Je voudrais te dire que la graine que tu as semée a germé fleuri, au moment où la cueillette est imminente nous constatons une immense vide. Un vide que nul ne peut combler. Tu as cultivé en nous l'amour et le respect pour les autres le sens de l'honneur, de la dignité et de la justice; tu nous as quittés trop tôt. Ce travail est le fruit de ton sacrifice. Que DIEU t'accueille dans son paradis. Amen !!!

A mes tontons, **BENGALY Moussa, Issa, Chacka, Loseni** : les mots me manquent pour vous témoigner ma reconnaissance. Votre simplicité, votre sens élevé de la responsabilité et votre humanisme ont fait de vous un modèle. Merci pour l'ensemble des efforts consentis tout au long de ce cycle. Ce travail est aussi le vôtre. Qu'Allah vous accorde une vie longue et prospère pleine de bonheur.

A ma tante Mme **BENGALY Tjimongo SANOGO** : mère exemplaire, celle qui ne fait point de différence entre ses enfants et ceux des autres, celle qui accepte de partager, aussi minime qu'il soit le peu qu'elle possède avec les autres. Femme dynamique, généreuse, loyale, sociable, attentionnée et infatigable qui n'a jamais cessé de m'appuyer dans mes entreprises.

Qu'Allah me gratifie de votre présence pour une très longue période riche de promesses.

A mes sœurs **BENGALY Afouchata, Mariam, Maimouna, Djénéba, Mafounè, Abibata, Mme COULIBALY Sali BENGALY** : je ne vous remercierai jamais assez pour tout le soutien dont j'ai bénéficié auprès de tous. Qu'Allah vous récompense d'une vie pleine de bonheur et de richesse dans la santé.

A mes frères **BENGALY Abdoulaye, Bourama, Soumaila, Mahamadou, Lassina, Solomane, Aboubacary, Salif, Issa, Yssouf, Bamory, Abdramane Sidi**: ce travail est le vôtre également ; si je suis là aujourd'hui c'est quelque part grâce à vos encouragements et vos soutiens. Merci pour l'accompagnement tout au long de ce cycle.

A mes cousins et cousines : **Aboubacar BENGALY, Fousseyni BENGALY, Issouf BENGALY, Fatoumata DEMBELE, Aminata DEMBELE, Fatoumata Soumba SAMAKE...**, bref à toute la famille COULIBALY pour l'hospitalité, la générosité et le soutien.

A la famille BENGALY à Sikasso et à la famille SANOGO à Hamdallaye pour vos encouragements, conseils et bénédictions tout au long du cycle

- A mes Amis :

**Dr Kotié DOUMBIA**, mon ami, mon plus que frère celui sans qui cette aventure n'aurait pas été ce qu'elle est. Je n'ai jamais eu l'occasion de te remercier pour ces années de dur labeur mais fabuleuses passées ensemble. Trouve à travers ce document l'expression de ma plus grande admiration et de mon profond respect.

A **Dr Aly OUATTARA, Dr Stapha COULIBALY, Dr Abdramane DIALLO, Dr Adama GOITA, Dr Hamadi TRAORE, Dr Mme OUATTARA Djénéba CAMARA Dr Yossouf**

**DIARRA, Daouda DIAMOUTENE...** . Vous avez été plus que des amis, vous étiez une famille. J'ai beaucoup appris de vous tout au long du cycle tant sur le plan social que d'éducatif. Si j'y suis arrivé, c'est quelque part grâce à vous. Soyez-en remerciés pour ces années de franche collaboration dans l'entente et la courtoisie. Qu'Allah fortifie et bénisse ce lien d'amitié tissé jusqu'à la fin des temps.

- A la promotion « **Pr Benoit Yaranga KOUMARE**»: pour ces années de durs labeurs que nous avons passés ensemble. Au corps professoral de la faculté de Pharmacie et de la Faculté de Médecine et d'odontostomatologie pour la qualité de l'enseignement reçu.

- A l'ensemble du personnel du Centre National de Transfusion Sanguine: **Pr BABY Mounirou Directeur du centre, Dr Amadou DIARRA Directeur Adjoint, Pr Aboubacar MAIGA, Dr Alhassane BA, Dr Hassana GUITTEYE, Dr FOMBA Minkoro, Dr Diakardia TRAORE, Dr DIABATE Idrissa, Alpha GUINDO, Gaoussou TOGORA, Adama KAYENTAO, Ramatoulaye DIALLO, Dr Moussa CISSE, , Sira DEMBELE, Mme YARA Kadiatou TAPO, , SANGARA Hamidou, Maïmouna KODIO, Adama TRAORE, Sadiourou DIARRA** pour ces années de riches et fructueuses collaborations passées ensemble et pour la qualité de l'encadrement reçu dans la courtoisie et l'entente et à l'ensemble du personnel du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux du Mali.

- Aux internes du service, Mme **BALLO Louis Portio BALLO, Bamadou DEMBELE, Sounlé DIASSANA** pour la confiance et l'estime placée en ma modeste personne.

- A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, à l'élaboration de ce document.

**HOMMAGES  
AUX  
MEMBRES DU JURY**

## **A notre Maître et Président du jury**

**Pr Daouda Kassoum Minta**

- ✓ **Professeur Titulaire des Maladies infectieuses et Tropicales**
- ✓ **Praticien hospitalier au service des Maladies infectieuses et tropicales du CHU Point G.**
- ✓ **Directeur du centre d'excellence de lutte contre le VIH adulte.**
- ✓ **Chercheur au département d'épidémiologie et des affections parasitaires des Facultés de Médecine d'Odonto-Stomatologie et de Pharmacie de l'Université des Sciences Techniques et Technologie de Bamako (FMOS/FAPH/USTTB).**
- ✓ **Vice-président de la société Africaine de Pathologies Infectieuses.**

**Cher Maître,**

Permettez-nous de vous remercier pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de notre thèse malgré vos multiples occupations.

Vos qualités humaines et scientifiques, votre amour pour le travail bien fait, votre disponibilité et votre engagement pour la culture de l'excellence font de vous un maître exemplaire.

Trouvez ici cher Maître, l'expression de notre profonde gratitude et de notre sincère reconnaissance.

**A notre Maître et juge**

**Pr Moussa Tiémoko DIARRA**

- ✓ **Professeur Titulaire d'Hépatogastro-entérologie à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie de Bamako (FMOS)**
- ✓ **Praticien hospitalier à l'Hôpital Gabriel Touré**

**Cher Maître,**

Vous nous aviez été accessible, du début de ce travail jusqu'à la fin.

Votre disponibilité, votre modestie et votre rigueur dans le domaine médical font de vous un homme respecté et admiré de tous.

Vos remarques et suggestions ont beaucoup contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Veillez accepter cher Maître, nos remerciements, nos sentiments d'estime et de profond respect.

## **A notre Maître et juge**

### **Dr Ibréhima GUINDO**

- ✓ Pharmacien biologiste,
- ✓ Maître- Assistant de Bactériologie- Virologie
- ✓ Responsable du laboratoire des IST/VIH de l'INRSP

### **Cher Maître,**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury.

Votre abord facile, votre simplicité et votre rigueur sont des atouts qui nous ont fasciné.

Ces dispositions naturelles couplées à vos qualités font de vous un biologiste exceptionnel.

Recevez ici l'expression de notre profond respect.

## **A notre Maître et Co-Directeur de thèse**

### **Dr Amadou DIARRA**

- ✓ Médecin Spécialiste en Médecine Transfusionnelle,
- ✓ Chargé de recherche,
- ✓ Titulaire d'un Doctorat en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques,
- ✓ Directeur Général Adjoint du Centre National de Transfusion Sanguine,
- ✓ Membre de la Société Africaine de Transfusion Sanguine (SATS)

### **Cher Maître,**

Votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre souci du travail bien fait, ont forcé notre admiration.

Vous nous avez reçu dans votre service avec beaucoup d'amabilité.

Nous garderons de vous, l'image d'un homme de science, de culture, de principe.

Soyez rassuré honorable maître de notre reconnaissance.

## **A notre Maître et Directeur de thèses**

### **Pr Bouréma KOURIBA**

- ✓ Maître de conférences Agrégé d'immunologie,
- ✓ Chef de l'unité d'immunologie Cellulaire et Moléculaire du MRTC/DEAP,
- ✓ Directeur Scientifique du Centre d'infectiologie Charles Mérieux (CICM) de Bamako,
- ✓ Président de la Société Malienne d'Immunologie.

### **Cher Maître,**

C'est un privilège et un grand honneur que vous nous avez fait en nous confiant ce travail.

Au-delà de vos qualités de pédagogue reconnues par tous, nous avons découvert en vous un homme plein de générosité, de simplicité et rigoureux dans le travail.

Nous avons été séduit par la qualité de votre savoir scientifique, votre ouverture envers les étudiants, et de votre grande disponibilité.

Merci d'avoir accepté de diriger notre travail.

C'est donc l'occasion pour nous de vous exprimer nos vives émotions et vous remercier pour tout.

# **SIGLES ET ABREVIATIONS**

## SIGLES ET ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide Désoxy Ribonucléique
<b>ADNccc</b>	ADN circulaire clos de façon covalente
<b>Ag</b>	Antigène
<b>AgHBc</b>	Antigène de capsidite ou de core du virus de l'hépatite B
<b>AgHBe</b>	Forme soluble de l'AgHBc
<b>AgHBs</b>	Antigène de surface (antigène Australia) du virus de l'hépatite B
<b>ALAT</b>	Alanine Amino-Tansférase
<b>Anti-HBs</b>	Anticorps anti-HBs
<b>Anti-HBc</b>	Anticorps anti-HBc
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNaseH</b>	Ribonucléase H
<b>ARV</b>	Antirétroviraux
<b>ASAT</b>	Aspartate Amino-transférase
<b>BAMS</b>	Bachelor de Biologie Médicale Appliquée
<b>CI</b>	Contrôle Interne
<b>CICM</b>	Centre d'Infectiologie Charles Mérieux
<b>CNTS</b>	Centre National de transfusion sanguine
<b>Ct</b>	Cycle threshold
<b>CY5</b>	Marqueur fluorescents de la famille des cyanines.
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra-Acétique

<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
<b>EPST</b>	Etablissement Public à Caractère Scientifique et Technologique
<b>Et OH</b>	Ethanol
<b>Fam</b>	5-Carboxyfluorescein
<b>GTC</b>	Thiocyanate de guanidine
<b>HBV</b>	Hepatitis B virus
<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>IgM</b>	Immunoglobuline M
<b>LRM</b>	Laboratoire Rodolphe Mérieux
<b>Mix</b>	Mix enzymatique
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la Santé
<b>Pb</b>	Paire de base
<b>PCR</b>	Polymerase by Chain Reaction
<b>PSL</b>	Produits Sanguins Labiles
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>ROX</b>	Carboxy-X-rhodamine
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TP</b>	Taux de Prothrombine
<b>UV</b>	ultra-violet
<b>VHB</b>	Virus de l'hépatite B
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine

## TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION .....	1
II. OBJECTIFS.....	3
2.1. Objectif général .....	3
2.2. Objectifs spécifiques .....	3
III. GENERALITES .....	4
3.1. Historique :.....	4
3.2. Epidémiologie :.....	4
3.3. Modes de transmission :.....	5
3.3.1. La transmission parentérale :.....	5
3.3.2. La transmission sexuelle :.....	6
3.3.3. La transmission verticale :.....	6
3.4. Structure du VHB : .....	6
3.4.1. Le génome du VHB :.....	7
3.4.2. Organisation du génome :.....	8
3.5. Marqueurs biologiques de l'hépatite B .....	9
3.5.1. Marqueurs non spécifiques .....	9
3.5.2. Marqueurs spécifiques .....	9
3.6. Réplication virus .....	10
3.7. Physiopathologie .....	12
3.8. Diagnostic biologique : .....	14
3.9. Prévention et Traitement: .....	15
3.9.1. Prévention de l'infection par le VHB :.....	15
3.9.2. Traitement.....	16
IV. DONNEURS ET METHODES .....	18
4.1. Cadre d'étude.....	18
4.2. Type et période d'étude.....	19

4.3. Population d'étude.....	20
4.3.1. Critères d'inclusion.....	21
4.3.2. Critères de non inclusion.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.3.3. Echantillonnage.....	21
4.4. Variables étudiées.....	39
4.4.1. Variables socio-démographiques .....	40
4.4.2. Variables biologiques .....	40
4.5. Méthodes des mesures des variables .....	40
4.5.1. Sélection des donneurs de sang.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.5.2. Prélèvements sanguins.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.5.3. Analyses biologiques .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.5.4. Méthodes biochimiques .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.5.5. Méthodes moléculaires .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.6. Analyse statistique .....	40
4.7. Aspects éthiques .....	40
V. RESULTATS .....	41
5.1. Sociodémographiques.....	41
5.2. Charge virale hépatite et autres marqueurs .....	45
VI. DISCUSSIONS .....	51
6.1. Aspects sociodémographiques.....	51
6.2. Caractéristiques des marqueurs viraux de l'hépatite B .....	52
VII. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	55
7.1. Conclusion.....	55
7.2. Recommandations .....	55
REFERENCES .....	56
ANNEXES .....	1

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Contenu des cartouches Viral NA.....	25
Tableau II: Programme d'amplification de l'ADN du VHB.....	39
Tableau III: Répartition des donneurs de sang de l'étude selon le nombre de don. .	43
Tableau IV: Répartition des donneurs de sang de l'étude selon le groupe sanguin et la nature de don. ....	44
Tableau V: Fréquence des donneurs de sang porteurs de l'antigène HBs ayant une réplication virale.....	45
Tableau VI: Répartition des donneurs de sang selon la charge virale.....	45
TableauVII: Répartition des donneurs de sang de l'étude en fonction du portage de l'Ag HBe.....	45
Tableau VIII: Répartition des donneurs de sang de l'étude en fonction du portage des IgM anti-HBc.....	46
Tableau IX: Répartition des donneurs de sang de l'étude en fonction du portage des IgG anti-HBs. ....	46
Tableau X: Répartition des donneurs de sang de l'étude en fonction du niveau sérique de l'ASAT.....	46
Tableau XI: Répartition des donneurs de sang de l'étude selon le niveau d'ALAT...	47
Tableau XII: Distribution des donneurs de sang ayant un taux d'ASAT élevé en fonction de l'intensité de la charge virale de l'hépatite B.....	47
Tableau XIII: Relation entre la charge virale et l'ALAT. ....	48
Tableau XIV: Relation entre la charge virale et l'AgHBe. ....	48
Tableau XV: Relation entre la charge virale et l'IgM anti-HBc. ....	49
Tableau XVI: Relation entre la charge virale et l'IgG anti-HBs. ....	49

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence de l'infection par le VHB dans le monde [12].	5
Figure 2 : Représentation schématique des différents constituants du VHB.	7
Figure 3: Organisation génomique du virus de l'hépatite B	9
Figure 4: Réplication du virus	12
Figure 5: Extracteur d'ADN Automate Arrow/LIAISON IXT®	24
Figure 6: Comment Assembler la pompe et la pointe.	33
Figure 7: Montage correct et incorrect de l'ensemble pompe-pointe.	33
Figure 8: Insertion de l'ensemble pompe-pointe et clip porte-pointe.	34
Figure 9: Cartouche Viral NA.	34
Figure 10: Percer franchement les puits.	35
Figure 11: Plateau chargé.	35
Figure 12: Thermocycleur CFX96™ Real-Time System BIO RAD®.	27
Figure 13: Répartition des donneurs de sang de l'étude selon le type de don.	42
Figure 14: Répartition des donneurs de sang selon le sexe.	42
Figure 15: Répartition des donneurs de sang selon les tranches d'âge	43



## **I. INTRODUCTION**

Les hépatites virales sont des maladies infectieuses à transmission oro-fécale, parentérale et sexuelle. Elles sont caractérisées par une atteinte prépondérante du système des phagocytes mononuclées et du parenchyme hépatique [1].

Elle évolue sous une forme aiguë et chronique avec un grand polymorphisme des manifestations cliniques, depuis les variétés asymptomatiques et frustes jusqu'aux formes graves et mortelles avec une intoxication générale, ictère, hémorragie et autres signes d'insuffisance hépatique [1]. Le foie, un organe vital, est la plus grande glande du corps humain et une véritable usine intervenant dans le métabolisme glucidique et synthétise certains marqueurs précurseurs dans l'hématopoïèse en éliminant les produits toxiques par voie biliaire. Plusieurs types de virus sont en cause dans ces affections du foie parmi lesquels: le virus de l'hépatite A (VHA), le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'hépatite D (VHD) et le virus de l'hépatite E (VHE). Les 3 types de virus les plus fréquemment rencontrés sont: le VHA, le VHB et le VHC.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé qu'environ 240 millions de personnes souffrent d'une infection chronique et entre 500 000 et 700 000 décès chaque année [2]. Le VHB est la 9<sup>ème</sup> cause de mortalité dans le monde avec un million de morts, chaque année par hépatite fulminante, cirrhose ou par cancer du foie. Il est à l'origine de 80% des cancers du foie dans certains pays notamment en Asie et en Afrique [3]. C'est pourquoi les hépatites ont été classées par l'organisation mondiale de la Santé, au cours de sa 63<sup>ème</sup> conférence, comme quatrième priorité de Santé Publique après le paludisme, la tuberculose et le VIH/SIDA. Selon une étude effectuée par *Mohsen et al.* en 2002 environ 57 % des cas de cirrhose du foie et 78 % des cancers primitifs du foie résultent d'une hépatite B ou C [4].

Au Mali l'hépatite B a fait l'objet de nombreuses études [5–7] qui ont montré que sa prévalence est élevée chez les donneurs de sang au CNTS de Bamako, la prévalence variait entre 14,9% et 16,14% [8,9]. La prévention de la transmission de l'hépatite virale B par le sang s'effectue par le dépistage systématique chez les donneurs. Le screening des donneurs de sang s'effectue par les tests rapides ou les tests ELISA. Ces techniques présentent une bonne sensibilité mais une spécificité moyenne. Ce

qui peut avoir comme conséquence un taux de faux positifs relativement élevé réduisant significativement le nombre de dons de sang valides. Par ailleurs les résultats sérologiques sont le plus souvent communiqués aux donneurs de sang qui sont en même temps orientés vers les structures de soins. Les cliniciens demandent systématiquement une évaluation de la charge virale avant toute prise en charge.

L'utilisation des techniques moléculaires plus sensibles et plus spécifiques apporte une diminution de la fenêtre silencieuse et élimine les faux positifs dans la détection des virus transmissibles par le sang **[10]**.

Au Mali, le dépistage de l'hépatite B est essentiellement sérologique et les tests moléculaires sont peu effectués. Nous avons effectué cette étude dans le but d'évaluer l'intérêt de la mesure de la charge virale chez les donneurs de sang à Bamako.

## **II. OBJECTIFS**

### **2.1. Objectif général**

Evaluer la charge virale de l'hépatite B par la méthode moléculaire chez les donneurs de sang à Bamako au Mali.

### **2.2. Objectifs spécifiques**

- 1) Déterminer la fréquence de la réplication virale chez les donneurs de sang porteurs de l'antigène HBs;
- 2) Mesurer l'intensité des charges virales chez les donneurs de sang porteurs de l'antigène HBs;
- 3) Comparer les taux de transaminases chez les donneurs de sang porteurs de l'antigène HBs ayant une réplication virale avec ceux qui ne l'ont pas ;
- 4) Déterminer la fréquence du portage de l'antigène HBe chez les donneurs de sang à Bamako;
- 5) Identifier les donneurs de sang porteurs des IgM anti-HBc et IgG anti-HBs.

### **III. GENERALITES**

#### **3.1. Historique :**

L'histoire des hépatites remonte à plus de 5 siècles avant Jésus Christ. Hippocrate l'avait décrit en attribuant la responsabilité de ses manifestations cutanées et muqueuses au foie.

Un siècle et demi après Jésus Christ, Galien distinguait les jaunisses liées à des obstructions biliaires et les jaunisses purement hépatiques. Le terme hépatite fut employé pour la première fois par *Coelius Aurelianus*, auteur du médical romain du 5ème siècle après Jésus Christ. Les premiers cas ont été rapportés en 1947 par *Marc Callum* et *a/* pour distinguer l'hépatite épidémique à transmission essentiellement orale et l'hépatite parentérale.

En 1963, l'antigène Australia aujourd'hui appelé antigène de surface de l'hépatite B fut découvert par Blumberg dans le sérum d'un aborigène australien hémophile transfusé. La particule virale B dite particule de Dane a été identifiée par Dane et *a/* en 1970.

En 1972, *Magnus* et *Mark* ont décrit le système HBe lié à l'infectivité. Le vaccin est mis au point en 1974.

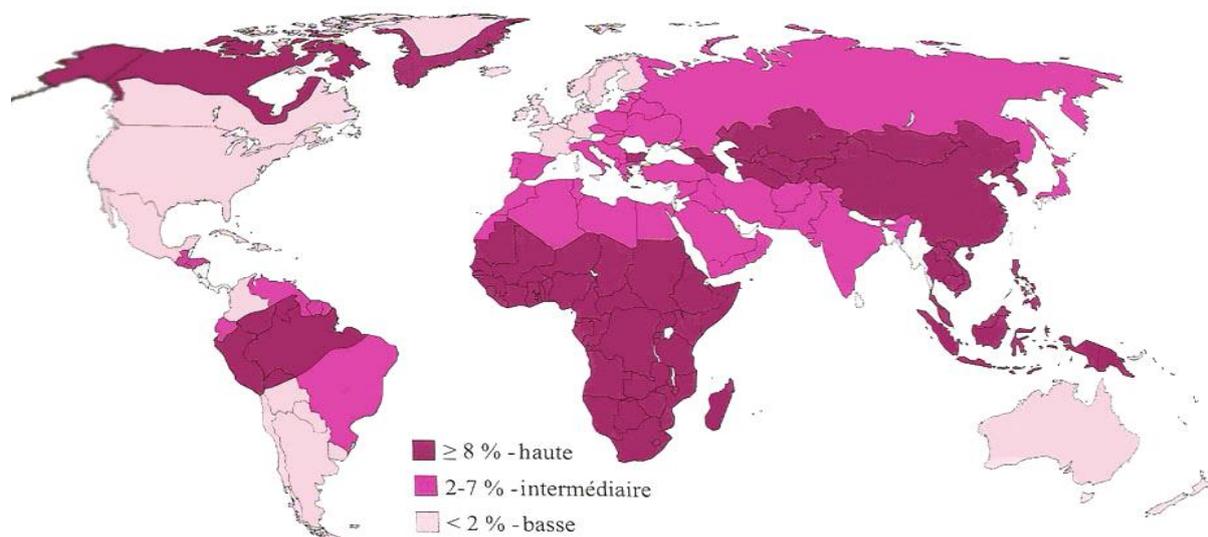
#### **3.2. Epidémiologie :**

L'infection par le VHB est cosmopolite. Environ deux milliards de personnes dans le monde sont contaminées par le virus de l'hépatite B, dont plus 350 millions porteurs chroniques. Le VHB est responsable d'1,2 million de décès par an dans le monde [11]. Il existe schématiquement trois zones de prévalences dans le monde (**figure1**)[12].

- Une zone de très forte prévalence représentée par la Chine, l'Asie du sud est et l'Afrique sub-saharienne ou la prévalence est supérieure à 8%;
- Une zone de moyenne prévalence composée par l'Europe de l'Est, le Moyen-Orient, l'Amérique du Sud avec une prévalence comprise entre 2-7% ;
- Une zone de basse prévalence : Europe de l'Ouest, Australie et l'Amérique du Nord ou la prévalence est inférieure à 2%.

Pour les hépatites virales B et C, aucune donnée n'est publiée pour la population générale, toutefois selon la base de données de la cellule de planification et de statistique du ministère de la Santé du Mali, les prévalences de ces infections étaient

estimées en 2010 entre 14 et 19 % pour l'hépatite virale B et entre 5 et 9 % pour l'hépatite virale C (données non publiées).



**Figure 1 :**Prévalence de l'infection par le VHB dans le monde [12].

### **3.3. Modes de transmission :**

La transmission mère-enfant lors de l'accouchement, le contact avec le sang ou dérivés (toxico IV, tatouage), les relations sexuelles, les contacts familiaux ou collectivités (lésions cutanées, objets de toilette, promiscuité) constituent les différentes voies de contamination du virus de l'hépatite B.

#### **3.3.1. La transmission parentérale :**

L'exposition au sang contaminé lors d'injections pratiquées avec du matériel non stérile ou la transfusion de produits sanguins contaminés sont des causes courantes et évitables d'infection par les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C [13]. La transfusion de produits sanguins est un important facteur de contamination. Sont largement concernés les personnes polytransfusées, les hémophiles, mais aussi les hémodialysés et les transplantés d'organes.

On estime que les injections à risque sont chaque année à l'origine de 21 millions d'infections à virus de l'hépatite B. Une part importante des dons de sang n'est pas soumise au dépistage du virus de l'hépatite B ou ne fait pas l'objet d'un dépistage correct. Le risque de transmission du virus de l'hépatite B par transfusion sanguine

non sécurisée peut atteindre 70 % environ, selon le volume de sang transfusé et la charge virale [13].

Certaines pratiques pourraient être à l'origine de contamination : utilisation de matériels tranchants non stériles, les tatouages, percés d'oreille, acupuncture, scarifications rituelles, excision, circoncision, le partage des objets tranchants, vaccination de masse[11].

### **3.3.2. La transmission sexuelle :**

Tout comme le VIH, l'hépatite virale B est une infection sexuellement transmissible (IST). Il existe des comportements sexuels à risque tels que les rapports sexuels non protégés, la multiplicité des partenaires, l'homosexualité.

La transmission sexuelle explique la prévalence élevée des marqueurs du virus de l'hépatite B dans le sérum des sujets ayant des partenaires sexuels multiples chez les homosexuels mâles (prévalence cependant moindre depuis les années 1980 en raison de l'usage plus important des préservatifs, à cause de la pandémie VIH sida [14,15].

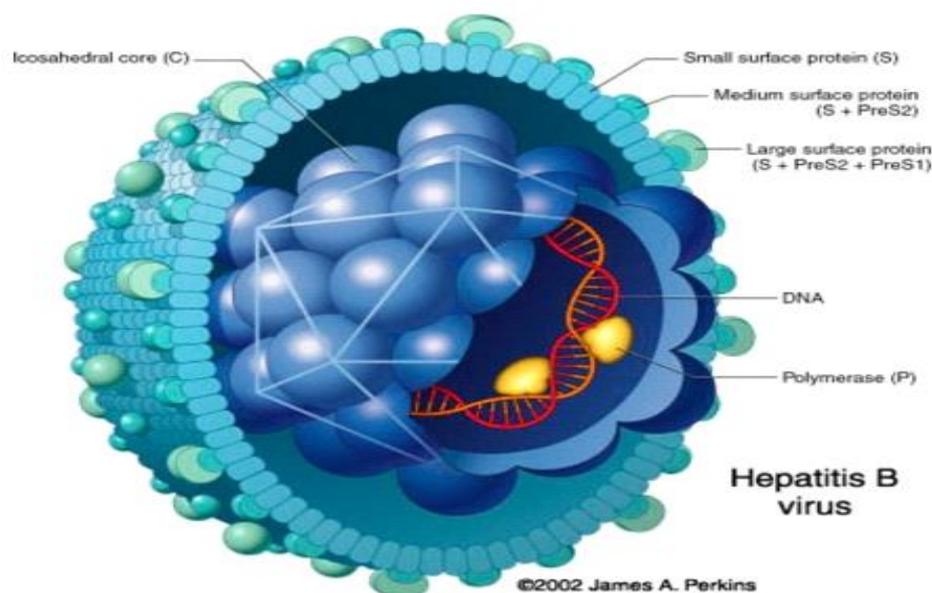
### **3.3.3. La transmission verticale :**

La transmission verticale du virus de l'hépatite B de la mère à l'enfant est due à l'exposition du nouveau-né aux sécrétions maternelles lors du passage dans la filière génitale ou pendant la période néonatale[16]. Elle peut être secondaire soit à une hépatite aiguë (dernier trimestre de la grossesse), soit à une hépatite chronique de la mère. Le risque de portage chronique du virus est en effet particulièrement élevé chez le nouveau-né infecté à la naissance (30 à 90 % des cas) [17].

Le virus de l'hépatite B est 50 à 100 fois plus infectieux et plus résistant que le VIH et représente un important risque professionnel pour les agents de santé et des gays. La contamination périnatale est fréquente notamment dans les pays de forte endémicité comme l'Asie du Sud-est et l'Afrique [11].

## **3.4. Structure du VHB**

Le virus de l'hépatite B appartient à la famille des Hepadnaviridae et au genre des orthohépadnavirus décrit en 1978 par Sommers et al. C'est un virus enveloppé possédant une capsidie icosaédrique formée d'un seul type de protéine (protéine C, correspondant à l'antigène HBc) et qui renferme une molécule d'ADN circulaire, bi caténaire sur environ  $\frac{3}{4}$  de sa circonférence, de petite taille (1,6 millions de Dalton) associé à une ADN polymérase ADN dépendante(**figure 2**).



**Figure 2 : Représentation schématique des différents constituants du VHB.**

Source:[http://untori2.crihan.fr/unspf/2010\\_Lille\\_Goffard\\_VHB/co/03\\_generalites.html](http://untori2.crihan.fr/unspf/2010_Lille_Goffard_VHB/co/03_generalites.html)  
(Consulté le 15 Janvier 2016)

### **3.4.1. Le génome du VHB :**

Le génome du VHB se présente sous forme d'un ADN de petite taille 3200 paires de bases. Dans le virion le génome est sous la forme d'un partiel double brin et fermé de façon non covalente.

Le brin long de polarité négative (-), dont la séquence est complémentaire de celle des ARN viraux, est complet. Il a une extrémité 3' libre tandis que l'extrémité 5' est liée de façon covalente à la protéine terminale (terminal protein : TP) codée par l'ADN viral.

Le brin court de polarité positive (+) a une extrémité 5' fixe, complémentaire des 224 premières bases du brin (-) qui assure la circularité de l'ADN viral.

Dans le noyau de l'hépatocyte, l'ADN viral est sous forme d'une molécule circulaire, fermée de façon covalente et super-enroulée (cccDNA : covalentlyclosedcircular DNA ouADNccc). Certains le comparent à un mini chromosome. Il sert de matrice pour la synthèse des ARN messagers (ARNm) viraux.

L'ADNccc est extrêmement stable au sein des hépatocytes. Il est à l'origine du portage chronique des phénomènes de réactivations.

### **3.4.2. Organisation du génome :**

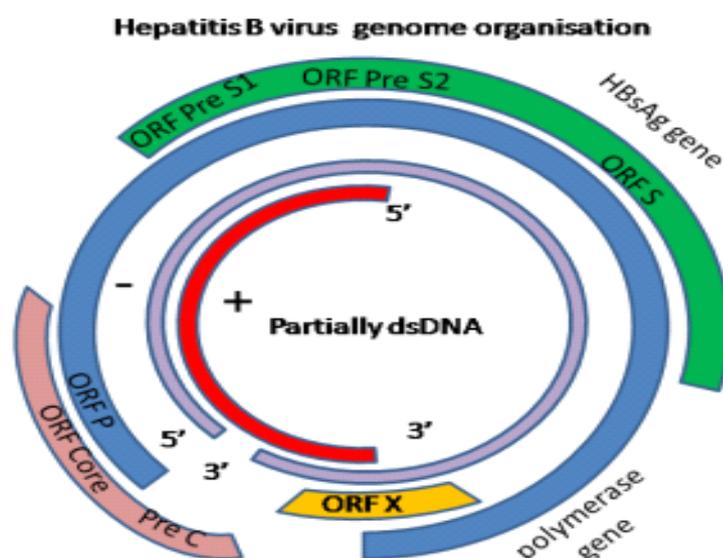
L'organisation du génome du VHB est extrêmement compacte, plus de la moitié étant lu sur plusieurs cadres de lectures (**figure 3**) :

Le gène préS/S, il code pour les trois protéines de surface selon *Charnay et al* en 1979 [18]. S (Small) qui correspond à la protéine majeure de l'enveloppe, préS2/S pour la protéine moyenne (M) et préS1/préS2/S pour la grande protéine L (Large). Elles sont lues en phase sur deux ARN différents et possèdent toutes la même spécificité antigénique HBs.

➤ Le gène préC/C, il code pour la protéine de capsid (protéine C ou antigène Hbc) selon *Pasek et al* en 1979 [19] et une protéine soluble excrétée dans le sérum après clivage (protéine E, antigène HBe). Bien que ces deux protéines soient traduites en phase, leurs spécificités antigéniques sont différentes.

➤ Le gène P, il représente 80% du génome du VHB et code pour trois peptides: protéine terminale, un spacer (région non codante) ; la polymérase proprement dite qui a une activité ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse) et la RNase H mais ne code pas pour une protéase.

➤ Le gène X, il code pour une protéine régulatrice HBx, qui du fait de son activité transactivatrice pourrait être impliquée dans la cancérogenèse induite par le VHB.



**Figure 3: Organisation génomique du virus de l'hépatite B**

Source:[http://untori2.crihan.fr/unspf/2010\\_Lille\\_Goffard\\_VHB/co/03\\_generalites.html](http://untori2.crihan.fr/unspf/2010_Lille_Goffard_VHB/co/03_generalites.html)  
(Consulté le 15 Janvier 2016)

### 3.5. Marqueurs biologiques de l'hépatite B

#### 3.5.1. Marqueurs non spécifiques

- Transaminases :

L'élévation des transaminases (ALAT et ASAT) permet de mettre en évidence une cytolysé hépatique. Leur valeur est entre 10 et 100 fois supérieures à la normale dans les hépatites aiguës. Au cours de l'hépatite chronique l'élévation est modérée (1 à 5 fois à la normale). L'ALAT est presque toujours supérieure à l'ASAT en l'absence de cirrhose, l'inverse se produit si c'est la cirrhose[7,20].

- Taux de prothrombine :

Ce taux est abaissé lors de l'hépatite sévère, (TP < 50%). Un taux < 30% définit l'hépatite fulminante. La Vitesse de Sédimentation est élevée et le taux de lymphocytes est abaissé en cas d'hépatite sévère.

#### 3.5.2. Marqueurs spécifiques

- Antigène HBs :

La présence de l'AgHBs dans le sang signale l'infection par le VHB. Il est détectable dans le sérum des sujets infectés entre 2 et 6 semaines après contamination. La persistance au-delà de six mois de l'AgHBs témoigne une infection chronique. Sa négativation dans le sérum permet de prédire une évolution favorable à la guérison [7,20,21].

- Antigène HBc :

Il est le témoin de la réplication virale dans le tissu hépatique d'un sujet atteint du VHB.

- Antigène HBe :

Détectable dans le sérum, sa présence témoigne une phase de réplication virale intense et d'une contagiosité importante[1]. La persistance de cet antigène plus d'un mois est un indice précoce de passage à la chronicité.

- ADN et ADN polymérase : marqueurs de la réplication virale.
- Les Anticorps - Anticorps anti- HBs :

Au cours d'une hépatite aiguë l'anti- HBs devient détectable lorsque l'AgHBs disparaît. Il confère une immunité protectrice vis-à-vis d'une réinfection par le VHB. Son apparition signe l'arrêt de la réplication virale et témoigne une infection ancienne en absence de vaccination [20].

- Anticorps Anti- HBc :

Ce sont des marqueurs très précoces de l'infection. Associés à l'AgHBs, ils traduisent une infection en cours. Ils sont de deux types : IgM Anti - HBc et IgG Anti- HBc, ce qui permet de dater l'infection. L'IgM Anti - HBc détectable pendant la phase pré-ictérique est le témoin d'une infection récente. Les IgG Anti- HBc témoignent une infection ancienne, ils persistent pendant des années voire toute la vie[1,20].

Les IgG Anti – HBc représentent les meilleurs marqueurs sur le plan épidémiologique.

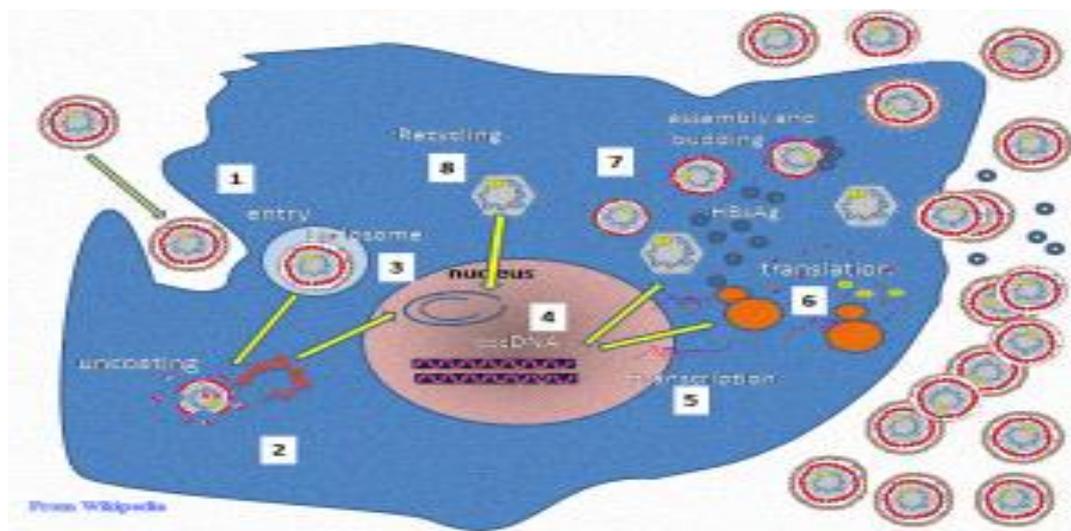
- Anticorps Anti- HBe :

Il apparaît dans le sérum quand l'AgHBe n'est plus détectable. Sa présence dans le sérum témoigne l'absence de réplication virale. Cependant certains sujets anti -HBe positifs peuvent avoir une infection virale active surtout si l'AgHBs ou ADN virale existe dans l'hépatocyte.

### **3.6. Réplication du VHB**

La première étape du cycle infectieux du virus commence par son attachement aux hépatocytes via la grande protéine d'enveloppe Pre-S/S (**figure 4**). Le mode d'internalisation des virions reste à ce jour encore peu connu, mais il aboutit au relargage de la capsidie dans le cytoplasme et à son adressage sous sa forme assemblée dans les paniers nucléaires de la cellule infectée selon *Rabe B et al* en 2003 [22]. La capsidie est démantelée dans le noyau, et l'ADN viral partiellement bicaténaire est relargué *Rabe B et al* en 2003 [22] puis réparé en ADN circulaire fermé de façon covalente (ADNccc). Cet ADN est ensuite transcrit en différents ARN dont la traduction donne naissance aux composants nécessaires à l'assemblage de nouveaux virions. Ces composants sont : la polymérase virale, responsable de la synthèse de l'ADN génomique, la protéine de capsidie, et les protéines d'enveloppe virales. Le plus grand des transcrits, l'ARN pré-génomique (ARNpg), de taille supérieure à celle du génome (3.5 kb), est inclus dans les capsides lors de leur assemblage et sert de matrice à la synthèse du brin (-) du génome du VHB par transcription inverse. Le brin (+) est ensuite synthétisé à l'intérieur de la capsidie. Les nucléocapsides peuvent suivre deux voies différentes.

Une partie d'entre elles sont réacheminées vers le noyau de manière à accroître la quantité d'ADNccc nucléaire. L'autre partie interagit avec les protéines d'enveloppe du VHB à la face cytosolique du réticulum endoplasmique (RE) et bourgeonne dans la lumière du RE sous forme de virions matures. Les virions sont ensuite sécrétés dans le milieu extracellulaire par la voie constitutive de transport vésiculaire selon *Schneider V* en 2001[45].



**Figure 4: Réplication du virus**

**Source:**[http://fr.wikipedia.org/wiki/virus\\_de\\_1%27hépatite\\_B#/media/File:HBV\\_replication.png](http://fr.wikipedia.org/wiki/virus_de_1%27hépatite_B#/media/File:HBV_replication.png). (Consulté le 15 Janvier 2016)

### **3.7. Physiopathologie**

L'hépatite virale a une évolution cyclique et se caractérise par la présence de 4 périodes : incubation, pré ictérique (prodromique), ictérique et convalescence.

#### **- Infection aiguë :**

Dans la plupart des cas, aucun symptôme ne se manifeste pendant la phase aiguë de l'infection. Cependant, certaines personnes présentent une maladie aiguë avec des symptômes qui durent plusieurs semaines, dont un jaunissement de la peau et des yeux (ictère), une coloration sombre des urines, une fatigue extrême, des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales.

Parmi les personnes atteintes d'hépatite aiguë, un petit nombre présenteront une insuffisance hépatique aiguë pouvant conduire au décès. Chez certaines personnes, le virus de l'hépatite B peut occasionner une infection chronique du foie susceptible d'évoluer ultérieurement en cirrhose hépatique ou en cancer du foie.

- une forme fulminante: 1 à 2% des cas environ. Les patients présentent des taux de prothrombine <45% et des signes neurologiques d'insuffisance hépatique [8].

- **Infection chronique :**

L'infection chronique est définie par la persistance de l'antigène HBs pendant plus de 6 mois après la contamination virale. Elle est le plus souvent asymptomatique. Le plus courant des symptômes étant une asthénie, qui peut être due à de multiples causes. Ainsi, l'infection au VHB est très souvent découverte tardivement et de manière fortuite. Par exemple, lors d'un don du sang, d'une grossesse ou d'un bilan sanguin. Le portage chronique du VHB est confirmé par la présence d'anticorps anti-HBc. L'hépatite chronique est caractérisée histologiquement par des lésions hépatiques associant nécrose hépatocytaire, infiltrat inflammatoire et fibrose.

Classiquement, une infection chronique par le VHB sauvage évolue en 3 phases successives.

- **Première phase :** La multiplication intense du VHB

Sur le plan de la sérologie, cette phase est caractérisée par la présence des marqueurs de réplication virale dans le sérum, à savoir ADN du virus et antigène HBe. Cette phase dure une à plusieurs années.

- **Deuxième phase :** La phase de séroconversion HBe

C'est la phase au cours de laquelle la réponse immunitaire s'intensifie. Il y a diminution, puis disparition dans le sérum des marqueurs de réplication virale, d'abord l'ADN puis l'antigène HBe. L'activité de la maladie hépatique est, à ce moment très forte et peut conduire à des lésions sévères : fibrose extensive, voire cirrhose. Plusieurs tentatives de séroconversion, finalement abortives, sont remarquables au cours de cette phase.

- **Troisième phase**

Elle est caractérisée par l'absence des marqueurs de réplication et la présence de l'anticorps anti-HBe. Toutefois, bien que l'ADN ne soit plus détectable dans le sérum par les techniques d'hybridation classiques, il persiste une faible multiplication détectable par PCR. Durant cette phase, l'activité de la maladie hépatique est faible, voire nulle. Mais, il peut se reproduire une réactivation pendant cette phase. Ces 3 phases ont en commun la présence de l'AgHBs dans le sérum [23].

**Evolution :**

• **La cirrhose**

La cirrhose représente environ 20% des évolutions naturelles des hépatites chroniques.

**L'hépatocarcinome :**

Le virus de l'hépatite B est un puissant carcinogène. Le risque de développer un hépatocarcinome est multiplié par 100 chez les porteurs du virus de l'hépatite B. On déclare 530 000 cas de carcinome hépatocellulaire par an, dont 82% sont causés par une hépatite virale, et dont les deux-tiers sont des hépatites B [23].

### **3.8. Diagnostic biologique**

Le diagnostic de l'infection par le VHB, comme celui de toute infection virale repose sur deux types de tests : les tests indirects qui mettent en évidence les anticorps dirigés spécifiquement contre le virus (tests sérologiques) et les tests directs qui mettent en évidence les constituants de la particule virale (PCR par exemple pour le VHB). Le prélèvement sanguin permet de rechercher la présence d'antigène HBs. La positivité de ce test signifie seulement que la personne a été en contact avec le virus. Elle ne permet pas de savoir si le virus a été éliminé ou pas de l'organisme. De même les anticorps resteront dans le sérum du patient en cas de guérison. En cas de résultat positif, et si un doute persiste, un second test ELISA sera prescrit pour confirmation. Mais la plupart du temps, on s'aidera d'un dosage qualitatif de la charge virale plasmatique (PCR) en VHB. Ce test indique si l'ADN du VHB est retrouvé ou non, sans en déterminer la quantité circulante, sa sensibilité actuelle.

#### ➤ **Le diagnostic indirect**

Il repose sur des tests qui utilisent les antigènes viraux permettant la détection spécifique d'antigène VHB. Deux types de tests sont actuellement utilisés : les tests de dépistage utilisés en première intention et les tests de validation.

#### ➤ **Test de dépistage**

Il s'agit habituellement des tests ELISA. Les protéines recombinantes où les peptides de synthèse viraux sont fixés soit sur des microplaques soient sur des billes de polystyrène.

Les anticorps sont mis en évidence par immunocapture suivie d'une révélation enzymatique colorimétrique. Aujourd'hui les tests sérologiques de dépistage commercialisés sont des tests de quatrième génération. Ils incluent des protéines recombinantes et ou des peptides synthétiques codés à la fois par les régions structurales (capside et enveloppe).

➤ **Test de validation**

Ces tests utilisent une technique d'immunotransfert. Les antigènes viraux, souvent identiques ou voisins des antigènes utilisés dans le test de détection correspondant sont mobilisés sur des bandelettes de nitrocellulose en bande parallèle après transfert à partir d'un gel de migration électrophorétique. Les bandelettes de nitrocellulose sont incubées avec les sérums ou plasma testés et des contrôles positifs et négatifs.

Si des antigènes VHB sont réellement présents, ils réagissent avec les anticorps fixés sur les bandelettes. La réaction est ensuite révélée par immunoenzymologie et l'intensité de la bande est proportionnelle à la quantité d'antigènes spécifique fixés à l'anticorps recombinant.

Plusieurs tests sont disponibles sur le marché parmi lesquels : DetermineHBsAgAssay (Inverness Medical Professional Diagnostics), VIKIA HBsAg (BioMérieux), VirucheckHBsAg (OrchidBiomedicalSystems), CypressHBsAgDipstick (Cypress Diagnostics), HexagonHBsAg (HumanGmbH).

➤ **Le diagnostic direct:**

Les techniques classiques de détection et d'amplification de l'ADN du VHB sont progressivement remplacées dans les laboratoires de virologie par les techniques de PCR dite « en temps réel ». Ces dernières bénéficient d'un intervalle de quantification linéaire étendu, adapté à la mesure des charges virales observées en pratique clinique chez les patients traités ou non traités. Les techniques de PCR en temps réel sont plus sensibles que les techniques de PCR classiques, n'exposent pas au risque de faux positifs liés à des contaminations et ont la possibilité d'être entièrement automatisées, ce qui réduit considérablement le temps d'analyse (moins de 6 heures) [24].

### **3.9. Prévention et Traitement:**

#### **3.9.1. Prévention de l'infection par le VHB :**

Outre la vaccination il existe des moyens de prévention non spécifiques parmi lesquels, on peut citer :

L'application des règles élémentaires d'hygiène au sein des foyers ; l'élimination du don de sang des sujets AgHBs positifs ; l'extension du matériel à usage unique dans les centres de prestation et laboratoires d'analyses biomédicales; la désinfection

immédiate du matériel non jetable à l'eau de javel ou au glutaraldéhyde; les rapports sexuels protégés.

- **Vaccination :**

Depuis 1982, on peut éviter l'infection grâce à un vaccin. Le vaccin contre l'hépatite B ne guérit pas les porteurs, mais il est efficace de 90 à 95% pour prévenir l'apparition de cet état. Le vaccin anti-VHB est aussi le premier vaccin contre un cancer et le premier vaccin contre une infection sexuellement transmissible [11,17,20,25]. (

Un taux d'anti corps anti - HBs protecteurs (10 UI/ml) est obtenu 2 à 3 mois après le début de la vaccination [21].

- **Schéma de la vaccination anti-VHB :**

Trois injections par voie intramusculaire (dans la région deltoïdienne pour les adultes et dans la cuisse pour les nourrissons), la deuxième injection se fait un mois après la première et la troisième se fait 5 mois après la seconde.

- rappel un an après la première injection
- rappels tous les 5 ans.

- **Echec de la vaccination :**

- Les non ou faibles répondeurs sont : les personnes âgées: l'efficacité du vaccin décroît avec l'âge (ceci est notable dès 40 ans) les individus séropositifs au VIH : les personnes immunodéprimées ; les sujets atteints de défaillance rénale chronique les individus alcooliques.

- les personnes HLA DR3+ ou DR7+ : cette non réponse serait due à des défaillances au niveau des cellules T auxiliaires [23]. Il faut savoir que le tabagisme et l'obésité sont aussi des facteurs favorisant la non-réponse au vaccin.

### **3.9.2. Traitement.**

Le traitement a pour but de faciliter la séroconversion de l'Ag HBs au profit de l'anticorps anti- HBs, but rarement atteint. Alors on cherche à stopper la multiplication virale afin de diminuer l'activité de l'hépatite chronique et d'accélérer le passage à la phase de porteur inactif du virus. La séroconversion HBe (disparition de l'Ag HBe et apparition de l'anticorps anti- HBe) est un critère important, mais elle survient parfois tardivement.

Les moyens sont essentiellement médicamenteux et rarement chirurgicaux (hépatite fulminante 1% des cas). Les médicaments les plus utilisés sont :

- **Analogues nucléosidiques et nucléotidiques :**

Lamivudine, mais n'est pas utilisé en mono thérapie.

Entécavir ; Ténofovir

- **Interférons :**

Interféron alpha (IFN  $\alpha$ ) ; Interféron pégylé.

Les recherches menées sur le VIH ont été profitables pour le traitement anti- VHB. En effet, plusieurs molécules inhibant la transcriptase inverse du VIH sont également actives sur la polymérase du VHB [23].

- **Principe**

Il permet dans certains cas d'éviter l'évolution vers la cirrhose et donc d'éviter la survenue du carcinome hépatocellulaire. Le traitement interrompt la réplication du VHB et donc, avance le moment de la séroconversion HBs [23].

## **IV. DONNEURS ET METHODOLOGIE**

### **4.1. Cadre d'étude**

Notre étude s'est déroulée au Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) de Bamako en collaboration avec le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux du Mali (CICM).

- **CNTS**

Le Centre National de Transfusion Sanguine est un Etablissement Public à Caractère Scientifique et Technologique (EPST) créé par l'ordonnance 041/PRM du 20 septembre 2000, ratifiée par la loi N°01-027 du 01 juin 2001.

Il est situé à Quinzambougou en commune II du district de Bamako, le CNTS comprend cinq (05) départements:

- Département de l'Administration Générale
- Département de la Comptabilité Générale
- Département du Laboratoire qui est divisé en trois(3) sections :
  - La section d'Immuno-Hématologie là où ont lieu les groupages sanguins et leur confirmation à partir des poches.
  - La section Sérologie s'occupe du dépistage des marqueurs d'infection (VIH, VHB, VHC et la Syphilis).
  - La section Hématologie-Biochimie s'occupe des examens hématologiques et biochimiques.
    - Département Recherche et Formation
    - Département de la Promotion, Collecte, Conservation et Distribution des produits sanguins.

Selon le rapport d'activité 2015, le CNTS a collecté 51.912 poches de sang à Bamako.

- **CICM Mali**

Fruit de la collaboration entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation Mérieux, le CICM a été mis en place suite à la signature de l'Accord-cadre N° 0956/1899 du 18 février 2004 entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation Mérieux ainsi que la Convention du 16 janvier 2005 et son Protocole annexe du 11 mai 2011 entre le Ministère de la Santé et la Fondation Mérieux.

- 8 décembre 2003 : Création de la Fondation Mérieux Mali

- 15 janvier 2004 : Pose de la première pierre du CICM
- 17 janvier 2005 : Inauguration du CICM
- 2 mai 2005 : Démarrage des activités

Le CICM Mali comprend:

- Une Administration Générale.
- Un Centre de Formation avec une formation diplômante le BAMS (Bachelor de Biologie Médicale Appliquée), des formations qualifiantes et des formations par compagnonnage.
- Un laboratoire d'analyses médicales dénommé Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) avec des activités de recherche et des activités de routines.

Le CICM a pour mission de participer tout comme les autres structures du Ministère de la Santé et de l'hygiène publique au développement sanitaire du Mali par le service rendu aux malades, la formation, la recherche et le renforcement des capacités dans le domaine du diagnostic biologique, dans des conditions désintéressées au bénéfice de la population.

Les ressources humaines du CICMM sont composées de 29 agents, répartis entre les services techniques du LRM (17 agents) et les fonctions de support administratif, financier et logistique (12 agents).

Le LRM se compose des Laboratoires 1 et 2 aux seins desquels les activités de diagnostic sont effectuées, des laboratoires de recherche et d'un laboratoire P3 sous forme d'un conteneur. Le Laboratoire 1 offre le cadre et le matériel pour la réalisation des examens d'hématologie, de biochimie et d'immunologie, le laboratoire 2 prend en charge les examens de microbiologie (bactériologie, mycologie et parasitologie), Les laboratoires de biologie moléculaire permettent d'effectuer les études de recherche, le P3 est utilisé pour les pathogènes dangereux.

Le centre dispose également d'un laboratoire mobile pour le diagnostic des pathogènes émergents et re-émergents. Les activités de biologie moléculaire se déroulent dans 3 pièces : une sale d'extraction, une sale de préparation du « Mix » et la sale d'amplification.

## **4.2. Type et période d'étude**

Il s'agissait d'une étude transversale qui s'est déroulée de janvier 2015 à septembre 2016.

### **4.3. Population d'étude**

La population d'étude était constituée de l'ensemble des donneurs de sang ayant effectué un don au CNTS pendant la période d'étude avec une sérologie d'antigène HBs positive.

#### **4.3.1. Définitions opérationnelles**

- **Don de sang**

Un don de sang est un processus par lequel un donneur de sang est volontaire pour se voir prélever du sang qui sera traité et stocké dans une banque de sang puis servira lors d'une transfusion sanguine.

- **Donneur familial/de compensation** : Donneur qui donne son sang à la demande d'un membre de la famille ou de la communauté du patient.
- **Donneur volontaire bénévole régulier de sang** : c'est un donneur volontaire bénévole qui donne au moins 3 fois son sang par an.

**4.3.2. Critères d'éligibilité au don de sang** : Le candidat au don de sang doit satisfaire aux critères d'âge (18- 60ans) et de poids ( $\geq 55$ kg)

**4.3.3. Entretien médical** : Le donneur une fois enregistré à l'accueil est orienté chez un médecin qui l'examine et lui administre un questionnaire médical (**annexe 1**). Il interroge le donneur de sang sur son mode de vie, sur son état de santé et ses antécédents médicaux et décide s'il est apte ou pas au don de sang. A chaque don, le donneur doit faire systématiquement l'objet d'un contrôle clinique (l'étape clinique) qui comprend : entretien médical, examen général et mesure de la pression artérielle. Ces examens permettent de prendre en compte certaines contre-indications au don de sang : c'est la première étape importante en matière de sécurité transfusionnelle.

**4.3.4. Don de sang** : le donneur éligible est conduit dans la salle de prélèvement où il est installé dans un fauteuil approprié pour le prélèvement. La quantité de sang à prélever est indiquée par le médecin en fonction du poids, du sexe et de l'âge du donneur. Des prélèvements de sang (environ 4ml) seront effectués sur deux tubes l'un avec et l'autre sans un anticoagulant.

A la fin du don, le donneur reçoit une collation qu'il prendra sur place sous surveillance d'un agent de santé

Les poches de sang ainsi que les tubes sont conservés au frais entre 2° C et 6°C avant la réalisation des bilans biologiques (Dépistage de HIV, Ag HBs, Ac-HCV, BW et le Groupage sanguin).

#### **4.3.5. Critères d'inclusion et de non inclusion**

- Etaient inclus dans notre étude les sujets ayant donné leur consentement pour l'étude. N'étaient inclus les donneur ayant refusé de donner son consentement de participer à l'étude.

#### **4.3.6. Echantillonnage**

C'est un modèle d'échantillonnage simple permettant le recrutement systématique de tous les donneurs porteurs de l'AgHBs.

La taille minimum de l'échantillon a été estimée à 290. Les prévalences utilisées étaient celles obtenues précédemment au CNTS[8,9]

### **4.4. Méthodes de laboratoire**

#### **4.4.1. Matériels**

##### **4.4.1.1. Matériels et équipements pour la biochimie**

- Un portoir d'embouts;
- Des marqueurs pour tubes ;
- Une centrifugeuse Thermo scientific LABOFUGE 200 ;
- Une imprimante HP
- Eau distillée ou complètement déminéralisée ;
- Hypochlorite de Sodium (eau de javel) et bicarbonate de sodium ;
- KENZA 240TX et 450TX,
- Papier absorbant ;
- Gants à usage unique ;
- Tubes polystyrène (12 x 75 mm) à usage unique ;
- Pipettes automatiques ou semi-automatiques réglables ou fixes pouvant distribuer 10 µl, 100µl et 1 ml ;
- Éprouvettes graduées de 10 ml, 200 ml et 1000 ml ;

#### **4.4.1.2. Matériels et équipements pour l'ELISA**

- Un portoir d'embouts;
- Des marqueurs pour tubes ;
- Une minuterie ;
- Une centrifugeuse Thermo scientific LABOFUGE 200 ;
- Une imprimante HP
- Eau distillée ou complètement déminéralisée ;
- Hypochlorite de Sodium (eau de javel) et bicarbonate de sodium ;
- Papier absorbant ;
- Gants à usage unique ;
- Tubes polystyrène (12 x 75 mm) à usage unique ;
- Pipettes automatiques ou semi-automatiques réglables ou fixes pouvant distribuer 10 µl, 100µl et 1 ml ;
- Éprouvettes graduées de 10 ml, 200 ml et 1000 ml ;
- Agitateur type vortex ;
- Conteneur de déchets contaminés ;
- Système de lavage automatique, semi-automatique au manuel pour microplaque ;
- Bain marie, ou incubateur sec, pouvant être thermostaté à  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  ;
- Appareil de lecture pour microplaques, équipé de filtres de longueur d'onde 450/620-700 nm ;

#### **4.4.1.3. Matériels et équipements pour la biologie moléculaire**

##### **a. Extraction d'acide nucléique**

- Un extracteur d'ADN par l'automate LIAISON®IXT (DiaSorin, Ireland Ltd)
- Une centrifugeuse Sigma 3-18KS ;
- Des cryotubes de 1,5 ml stérile (avant la préparation des échantillons) ;
- Une hotte Captair®chemfiltair 633 ;
- Des boîtes de congélation pour cryotubes ;
- Une poubelle pour déchets contaminés ;
- Une poubelle pour déchets non contaminés ;
- Un vortex Fisher Scientific Top mix FB 15024®;
- Une micropipette de 5-50µl;
- Une micropipette 10-100µl;
- Une micropipette 100-1000µl;
- Un portoir pour microtubes;
- Des marqueurs pour tubes.
- Pointes à filtre jetable permettant la distribution de 250 µL, 10 et 5 µL ;
- Microtubes;
- Gants non talqués à usage unique ;
- Pompes ;
- Pointes ;
- Perforateur.



**Figure 5: Extracteur d'ADN Automate Arrow/LIAISON IXT®**

Le DiaSorin est un instrument automatisé flexible et compact pour l'extraction d'ADN de haute qualité et la séparation cellulaire à partir d'une variété d'échantillon renfermant une plaque chauffante.

#### **. Réactifs**

- Les réactifs sont contenus dans une cartouche d'extraction. La cartouche est organisée en puits contenant chacun un réactifs selon le tableau ci-dessous:

**Tableau I:** Contenu des cartouches Viral NA.

• Billes magnétiques dans un tampon de Stockage	1x500µ
• >25% de billes magnétiques à surface revêtue • >50% de H2O mQ • <0,005% d'azide de sodium	
Solution de lyse	1x800µl
• 40-70% de thiocyanate de guanidine(GTC) • <10% de solution saline • <50% de détergent	
Solution de lavage I	1x850µl
• 20-35% de thiocyanate de guanidine(GTC) • <5% de solution saline • <25% de détergent	
Solution de lavage II	1x1200µl
• 40-70% d'Et OH	
Tampon d'élution	1x400µl
• <12Mm de Tris	
Isopropanol	1x1300µl
H2O MQ	2x2500µl

**- Réactifs non fournis :**

- Protéinase K 100mg a préparé dans 1ml de tampon de stockage (Biocentric, Bandol, France) ;
- Contrôle interne (Biocentric, Bandol, France).

**b. Amplification**

- Une hotte Captair bio by erlab®;
- Une hotte Microflow Laminar Flow cabinet®;
- Une centrifugeuse pour microtubes ;
- Une poubelle pour déchets contaminés ;
- Une poubelle pour déchets non contaminée ;

- Un congélateur a - 25°C ;
- Un vortex ;
- Une micropipette de 0,5-10µl ;
- Une micropipette 10-100µl ;
- Une micropipette 100-1000µl ;
- Deux Portoirs pour microtubes ;
- Marqueurs pour tubes ;
- Plaques optiques de réaction "96-Well optical Reaction Plate" ;
- Films optiques ou « optical adhesivecover »
- Pointes à filtres, 100-1000 µL ;
- Pointes à filtres, 10-100 µl ;
- Pointes à filtres, 0,5-10 µL ;
- Microtubes ;
- Gants non talqués à usage unique.

#### **. Réactifs pour l'amplification**

Le Kit de réactifs d'amplification contient :

- Mix enzymatique 2X: mélange réactionnel comprenant l'ADN polymérase thermostable, marqueur ROX™, équilibré dans un tampon qui ne congèle pas à -20°C
- Amorces-sondes mix: oligonucléotides sens et anti-sens et la sonde TaqMan® (HBV and IC mixes)
- Control extraction
- 5 Standards HBV DNA (IU/mL):
  - o 5E7: Inactivated HBV particles,  $5 \times 10^7$
  - o 5E6: Inactivated HBV particles,  $5 \times 10^6$
  - o 5E5: Inactivated HBV particles,  $5 \times 10^5$
  - o 5E4: Inactivated HBV particles,  $5 \times 10^4$
  - o 5E3: Inactivated HBV particles,  $5 \times 10^3$
- CONTROL+ = (HBV DNA) particule inactive de HBV
- CONTROL- = Plasma humain non infecté sur tube EDTA
- Eau "RNAase free" non fourni avec le kit.
- "CFX96™ Real-Time instrument system (Bio-Rad® , California, USA)" = Ordinateur + thermocycleur ;

- un onduleur
- Centrifugeuse pour plaques 96 puits (Benchmark Scientific®Edison, USA;)
- Une poubelle pour déchets contaminés ;
- Une poubelle pour déchets non contaminés.
- Gants non talqués à usage unique.
- CFX qualification plate pour plaque optique 96 puits.



**Figure 6: Thermocycleur CFX96™ Real-Time System BIO RAD®.**

Le Thermocycleur CFX96™ est un automate d'amplification et de la détection d'acide nucléique permettant d'améliorer l'efficacité. En utilisant de quantités plus petites de matériau.

#### **4.4.2. Méthode**

##### **4.4.2.1. Prélèvement**

Les tubes de sang prélevés au cours du don de sang étaient utilisés pour les analyses biologiques et sérologiques. Le tube contenant un anticoagulant (EDTA) était destiné au groupage et à la mesure de la charge virale. Celui ne contenant pas d'anticoagulant

était destiné à la réalisation des analyses sérologiques (AgHBs, AgHBe, IgM-anti HBc, IgG anti-HBs) et les Transaminases.

- **Séparation et conservation des plasmas**

Les tubes sont transférés dans la salle d'extraction :

- Faire une centrifugation à 3500 tours/min pendant 10 minutes ;
- Après centrifugation, retirer les tubes de la centrifugeuse et les classer sur un portoir ;
- Passer sous la hotte à flux laminaire et marquer sur les microtubes eppendorf 1,5 µl suivant les numéros marqués sur les tubes de prélèvement ;
- Pour chaque échantillon, mettre dans 2 microtubes 250µl chacun de plasma du patient et fermer les microtubes;
- Classer les microtubes dans les cryoboites dédiées à cet effet ;
- Classer les dans le congélateur (-25°C) ou (-80°C) ;

#### **4.4.2.2. Dosage des marqueurs biochimiques**

Les marqueurs biochimiques dosés étaient les transaminases (ALAT et ASAT). Ces tests ont été réalisés en utilisant les réactifs de BIOLABO Diagnostics sur un automate **KENZA 240TX et 450TX**,

##### **Valeur élevée des transaminases hépatiques**

- **ALAT** élevée : Nous avons considéré comme **ALAT** élevée une valeur supérieure à **2 fois** la normale (**>2N**) avec une valeur normale comprise entre **5 - 50UI/L** ;
- **ASAT** élevée : Nous avons considéré comme **ASAT** élevée une valeur supérieure à **2 fois** la normale (**>2N**) avec une valeur normale comprise entre **5 - 50 UI/L**.

#### **4.4.2.3. Dépistage des marqueurs sérologiques du VHB**

Le dépistage des marqueurs sérologiques du VHB a été effectué par la technique d'ELISA de 4<sup>ème</sup> génération en utilisant des kits appropriés.

##### **4.4.2.3.1. Dépistage de l'antigène HBs:**

Le test utilisé est le Monolisa<sup>®</sup> Ag HBs ULTRA de laboratoire BIO-RAD France qui se présente sous forme de Kit contenant une plaque de 96 puits. C'est une technique

immuno-enzymatique basée sur le principe de sandwich en même temps utilisant 3 anticorps monoclonaux sélectionnés pour leurs capacités à se lier aux différents sous types de l'AgHBs.

- **Principe d'ELISA Ag HBs ULTRA:**

Il repose sur la fixation du marqueur recherché (Ag, Ac) à une phase solide (puits de microplaque, billes, micro-particules), grâce à des antigènes viraux pour la détection des anticorps et grâce à des anticorps monoclonaux pour la détection des antigènes. La révélation de la présence antigène-anticorps est assurée par la fixation d'enzyme transformant un substrat spécifique en composé coloré ou émettant un signal. La détection du signal est ensuite assurée par un spectrophotomètre selon le type de réaction. En pratique, les antigènes HBs (AgHBs) sont mis en évidence dans le sérum par de techniques immuno-enzymatiques chez les sujets porteurs du virus. L'élément essentiel du diagnostic d'une infection par le VHB en cours repose sur la mise en évidence dans le sérum de l'AgHBs.

- **Procédure (annexe 5)**

- 4.4.2.3.2. Dépistage de l'antigène HBe**

- **Principe d'ELISA HBe Ag-ab PLUS :**

La détection de l'Ag HBe repose sur une technique immunoenzymatique du type "sandwich" en deux temps, utilisant un anticorps Anti-HBe humain et un couple d'anticorps monoclonaux Anti-HBe marqués (Acm1 et Acm2) d'origine murine reconnaissant des épitopes différents.

La phase solide est constituée par 12 barrettes de 8 cupules en polystyrène sensibilisées avec l'anticorps Anti-HBe humain.

Les deux anticorps monoclonaux sont couplés à la peroxydase.

- **Procédure (annexe 8)**

- 4.4.2.3.3. Dépistage de l'anticorps IgM anti-HBc**

- **Principe d'ELISA HBc IgM PLUS :**

Monolisa™ HBc IgM PLUS est une technique immunoenzymatique de type "sandwich" en 2 temps avec capture des anticorps IgM sériques sur la phase solide puis addition du conjugué (protéine recombinante de l'antigène HBc originaire de levure et couplée à la peroxydase).

La phase solide est constituée par 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec un anticorps de chèvre anti-IgM humaine.

L'antigène HBc est directement couplé à la peroxydase.

- **Procédure (annexe 6)**

- **4.4.2.3.4. Dépistage de l'anticorps IgG anti-HBs**

- **Principe d'ELISA HBs IgG PLUS**

Echantillons et Contrôles sont incubés dans les cupules sensibilisées à l'antigène de surface de l'Hépatite B. Les anticorps anti-HBs éventuellement présents dans l'un des échantillons ou des contrôles se lient avec les antigènes formant ainsi un complexe immunologique antigène/anticorps.

L'excès d'échantillon est éliminé par une phase de lavage. Le conjugué ajouté se lie au complexes antigènes/anticorps formés précédemment dans les cupules. L'excès de conjugué est éliminé par une phase de lavage, puis une solution de révélation enzymatique est ajoutée dans chaque cupules. Il s'en suit une phase d'incubation.

Si un échantillon contient des anticorps anti-HBs, l'enzyme liée HRP entraîne une coloration du TMB de la solution chromogène qui devient bleue. Après addition de la solution d'arrêt, la coloration du substrat bleu vire au jaune.

Pour les échantillons ne contenant pas d'anticorps anti-HBs, la coloration du substrat disparaît des cupules qui deviennent incolores pendant la phase d'incubation et après addition de la solution d'arrêt.

L'intensité de coloration, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la concentration en anti-HBs de l'échantillon.

- Les valeurs d'absorbance mesurées par spectrophotométrie pour chaque échantillon sont comparées à une valeur seuil ( $V_s$ ) déterminée à partir du calibrateur 10 UI/ml. **Procédure (annexe 7)**

- **4.4.2.4. Charge virale**

La quantification de la charge virale a été effectuée par PCR quantitative en utilisant le test Generic HBV charge virale de BIOCENTRIC. C'est une technique de PCR en temps réel de quantification du nombre de copies de l'ADN du VHB dans le plasma humain. Le test est basé sur 2 procédés majeurs:

- L'extraction de l'ADN du virus à partir des échantillons de plasma EDTA. Elle a été effectuée sur l'automate Arrow/LIAISON IXT® (DiaSorin, Ireland Ltd) très performant.
- L'amplification /détection par PCR de l'ADN et la mesure de la fluorescence simultanée résultant du clivage du double brin de la sonde de détection oligonucléotidique spécifique à la cible HBV. Nous avons utilisé le CFX96™ Real-Time System BIO RAD® (California, USA) qui a une sensibilité et spécificité très élevée.

### **L'extraction de l'ADN du VHB :**

Cette étape se déroule dans la **SALE 1**

#### **a. Principe de la technique d'extraction par l'automate Arrow/LIAISON®IXT (DiaSorin, Ireland Ltd)**

Le principe de la procédure de purification repose sur l'utilisation de la surface solide des billes magnétiques pour immobiliser les acides nucléiques. Les acides nucléiques sont ensuite lavés et finalement élués dans un tampon d'éluion, puis sont transférés dans un tube de stockage. Le protocole viral NA permet de purifier un maximum de 12 échantillons en moins de 50 minutes. Les éluats sont ensuite prêts à être transférés sur un système d'amplification. La manipulation manuelle d'échantillons potentiellement infectieux est ainsi minimisée, ce qui garantit la sécurité de l'utilisateur et un traitement fiable des échantillons

#### **. Mode opératoire**

##### **- Contrôle de qualité**

Pour contrôler le processus de préparation des échantillons, il est recommandé de préparer un échantillon positif confirmé et de l'inclure dans le processus de purification avec les autres échantillons. Pour détecter et minimiser les erreurs dans les résultats diagnostiqués, des contrôles adéquats doivent également être utilisés conformément au mode d'emploi de la méthode de détection utilisée en aval.

**- Réalisation du test**

- **Préparation des échantillons, des standards, des contrôles à extraire**

Numéroter les microtubes

Décongeler les échantillons, les 5 standards, la protéinase K, les contrôles (température +15/ +25°C);

Distribuer 250 µL de plasma, standards, contrôles à extraire dans les microtubes;

Ajouter 10 µL de protéinase K dans les microtubes;

Ajouter 5 µL du contrôle interne vortexer ;

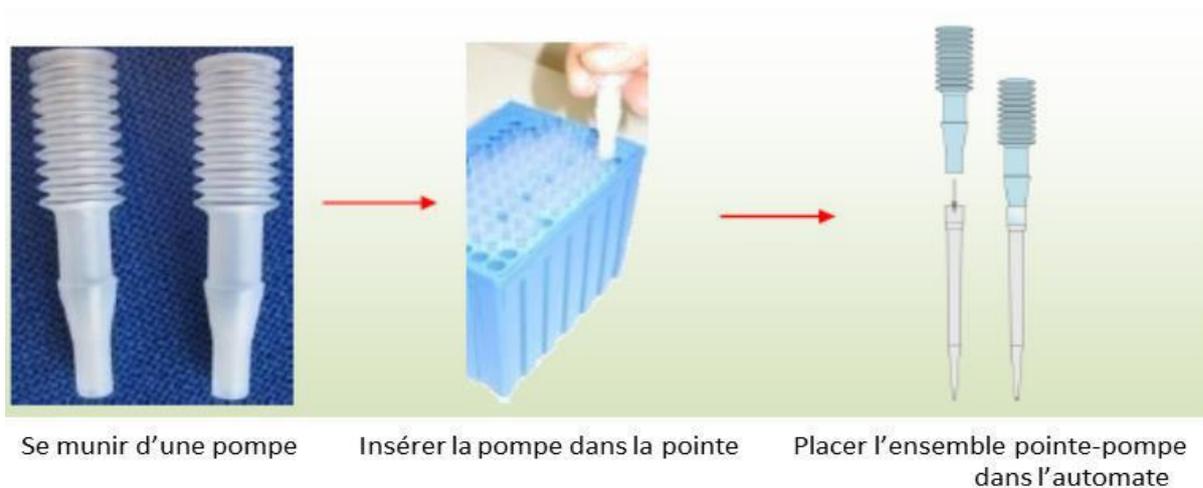
Incuber pendant 10 min.

- **Chargement de l'appareil**

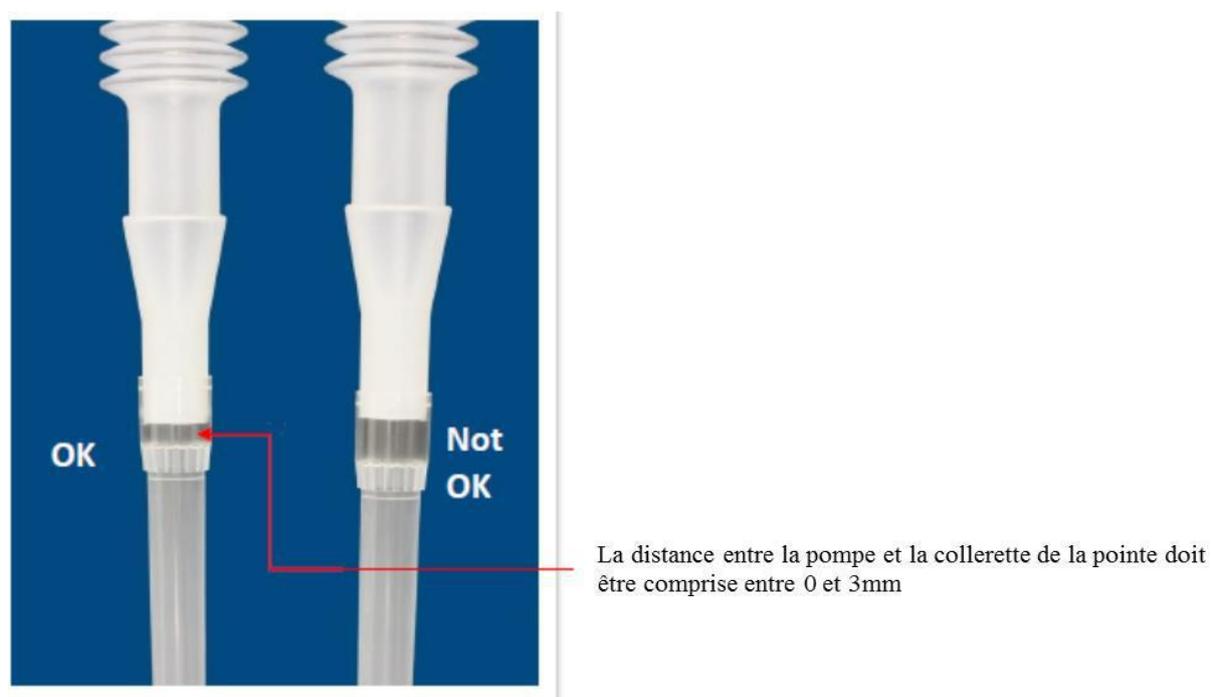
Allumer l'extracteur d'ADN.

Sélectionner le protocole d'extraction et les volumes correspondants à la quantité de plasma et d'éluât.

Assembler les pompes et les pointes; pour cela, tenir la pompe et l'insérer dans l'embout à l'intérieur du portoir, poussé vers le bas jusqu'à ce que la pompe et la pointe soient solidaires. La distance entre la pompe et la collerette de l'embout doit être comprise entre 0 et 3mm comme indiqué dans la figure ci-dessous;

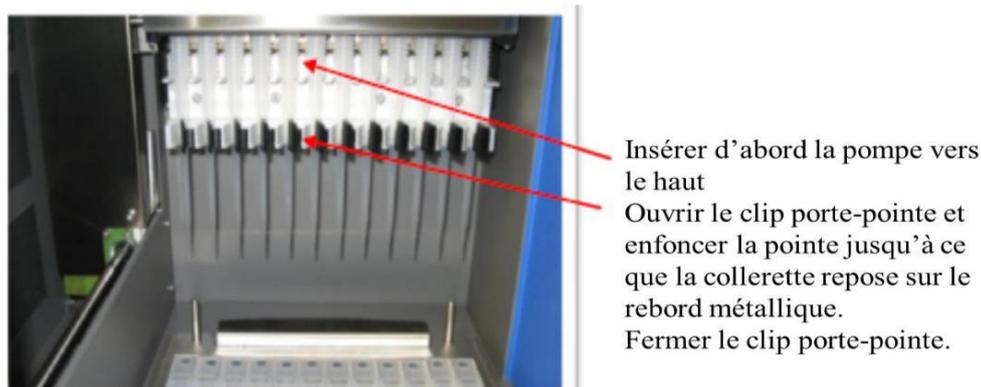


**Figure 7: Comment Assembler la pompe et la pointe.**



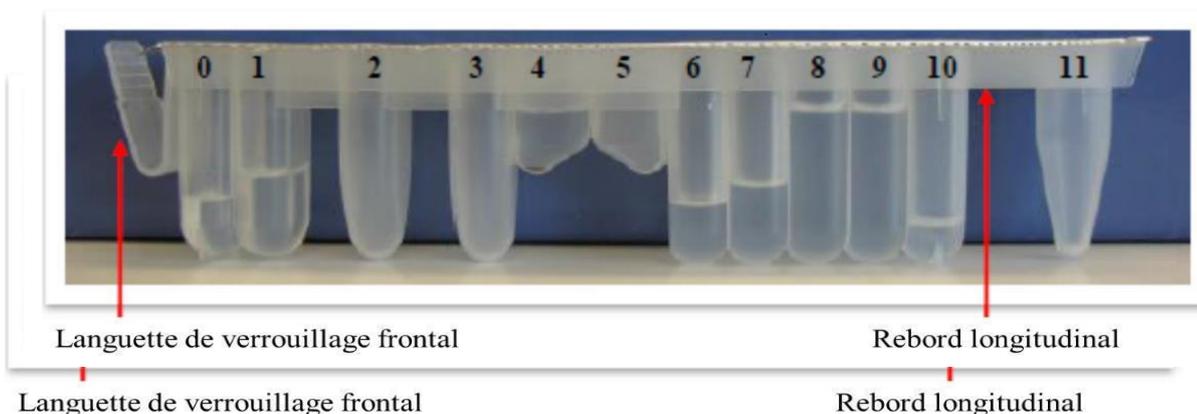
**Figure 8: Montage correct et incorrect de l'ensemble pompe-pointe.**

Chargement de l'ensemble pompe-pointe dans l'automate : installer l'ensemble pompe-pointe dans l'automate conformément aux figures ci-dessous



**Figure 9 : Insertion de l'ensemble pompe-pointe et clip porte-pointe.**

Charger la ou les cartouche(s) en la ou (les) plaçant dans le plateau et en appuyant fermement jusqu'à ce que la totalité du rebord longitudinal soit en contact direct avec le plateau. Les orifices d'insertion de la cartouche du plateau sont intentionnellement plus étroits afin que la cartouche reste bien positionnée pendant l'exécution de l'analyse. S'assurer que la cartouche est fermement maintenue par la languette de verrouillage frontal.



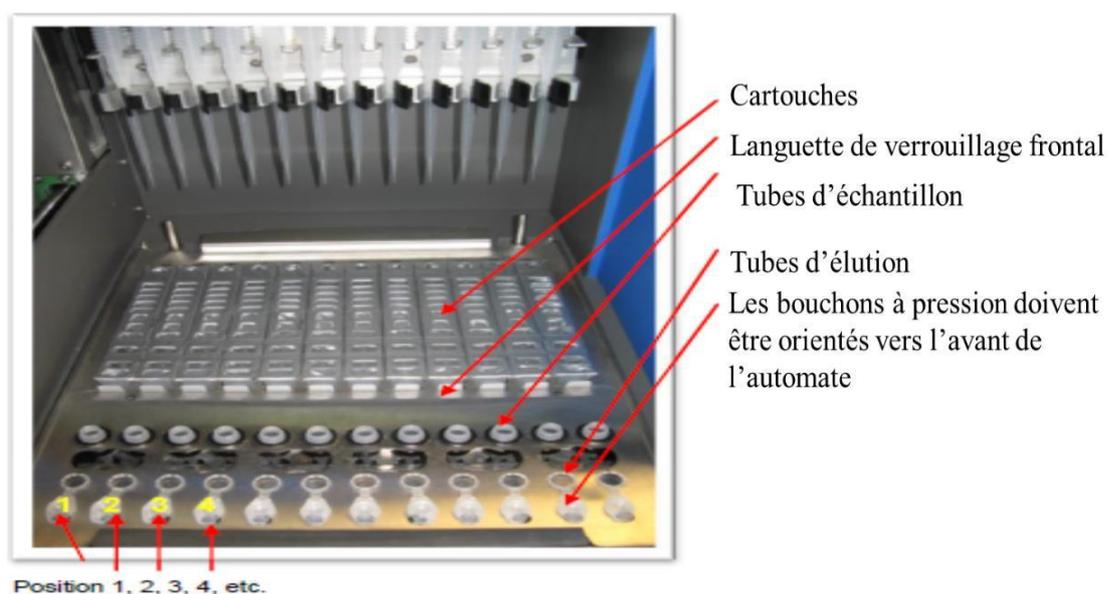
**Figure 10: Cartouche Viral NA**

Percer la ou les cartouche(s) comme indiqué dans la figure ci-dessous;



**Figure 61: Percer franchement les puits.**

Charger les échantillons préparés et disposés dans l'adaptateur et disposer les tubes d'élution (voir figure);



**Figure 72: Plateau chargé.**

Fermer la porte de l'extracteur et démarrer l'extraction ;

□ **Sélection du protocole et des volumes**

Mettre en marche l'automate Liaison IXT®;  
Appuyer sur «continue » sur le premier écran pour initialiser l'automate ;  
Appuyer sur «START PROTCOL » dans le menu principal ;  
Sélectionner le protocole viral NA ;  
Choisir les volumes d'échantillon de départ (250µL) et d'élution (50µL) ;  
Appuyer sur «START» pour lancer le test.  
A la fin des 45min d'extraction, recueillir les microtubes d'éluat et conserver à 4° si la PCR est réalisée le même jour ou à -25°C pour une amplification ultérieure;  
Nettoyage de l'automate à la fin de la session d'analyse (30 minutes au mode UV).

• **Préparation du mélange de la réaction**

Cette étape se déroule dans la **SALE 2**

**a. Mode opératoire**

Cette étape se déroule dans la **SALE 2**.

Décongelez les réactifs à température ambiante ou dans un réfrigérateur 2-8°C ; une fois décongelés, les réactifs peuvent être conservés entre 2-8°C pendant au plus 24 heures;

- **Réalisation du test**

Calculer le nombre N d'échantillons à tester pour une série, additionner les nombres de plasma de patients aux 5 standards (5E7,5E6,5E5,5E4,5E3) à tester en double (soit 10), le contrôle positif à tester également en double (soit 2), le contrôle négatif et l'eau pour PCR.

Dans un microtube stérile de 1,5ml préparer le master mix pour N échantillons. Pour N échantillons, il faut multiplier les volumes de réactif indiqués ci- dessous par N+4.

□ **Préparation du master mix : quantité pour 1 échantillon**

---

H2O	3,3 µL
Mix enzymatique	10 µL
Amorces / sondes mix	2,7 µL

Total 16 µL

---

Par exemple pour 10 plasmas à tester en une série, le nombre  $N = 10+10+2+1+1=24$

La quantité d' $H_2O$  est de  $3,3 \times (24+4)=92,4 \mu L$ .

□ **Distribution du master mix dans les puits de la plaque de réaction**

Manipuler sous la hotte;

Homogénéiser le master mix avec le vortex ;

A l'aide d'une pipette réservée à cet effet distribuez 16µl de master mix dans la plaque à 96 puits en allant du puits A de 1 à 12, ensuite le puits B de 1 à 12 ainsi de suite.

Utiliser le même embout pour distribuer le master mix dans tous les puits;

Vérifier visuellement que le mix a été régulièrement distribué dans chaque puits et transférer la plaque de 96 puits dans la **SALE 1**.

□ **Préparation de l'amplification :**

Cette étape se déroule dans la **SALE 1**

Mélanger avec un vortex les 5 standards, les contrôles, les échantillons, l'eau pendant 20 secondes et distribuer 4µL dans chaque puits correspondant. Ajouter 4µL d'éluât dans les puits selon le schéma de plaque. Les puits A1 à A5 ainsi que B1 à B5 sont occupés par les 5 standards testés en double. A6 et B6 sont occupés par le contrôle positif testés en double, A7 est occupé par le contrôle négatif, B7 est occupé par l' $H_2O$  pour PCR; les éluâts de patients sont disposés dans les puits A8 à A12 suivis de B8 à B12, puis de C1 à C12 ainsi de suite;

Vérifier visuellement que 20 µl ont bien été distribués dans chaque puits;

Recouvrir la plaque avec un film adhésif et passer dans la **SALE 3**.

• **PCR en temps réel**

Cette étape se déroule dans la **SALE 3**.

**a. Principe de la technique**

Le dosage Generic HBV charge virale est basé sur le principe de PCR en temps réel, par hydrolyse d'une sonde de détection oligonucléotidique marqué en groupement 5' avec reporter fluorescent et en 3' avec un «quencher » non fluorescent. Pendant la PCR, la sonde se fixe spécifiquement entre les deux sites d'hybridation des amorces sens et anti-sens et inhibe toute activité de la Taq polymérase, mais active sa fonction

5'→3' exo- nucléase clivant la sonde en libérant le reporter fluorescent du quencher non fluorescent. Cela résulte en une fluorescence détectable qui est proportionnelle à la quantité de produit PCR accumulé.

L'augmentation du signal de la fluorescence est détectable si seulement la séquence cible est amplifiée et est complémentaire à la sonde. Ainsi une amplification non spécifique ne peut pas être détectée. Grâce à ce principe réactionnel, l'augmentation de fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible pendant la PCR.

L'évolution de l'amplification est représentée par une courbe d'allure sigmoïde, pouvant être divisée en deux phases :

- une phase correspondant à une amplification exponentielle au cours de laquelle la quantité de produit de PCR obtenue à chaque moment est directement fonction du nombre de copies initiales. Au début de la phase d'amplification exponentielle, le moment où le signal sort du bruit de fond correspond à un certain nombre de cycles, appelé Ct (pour Cycle threshold).

- L'amplification exponentielle est suivie d'une phase de plateaux qui correspond à un ralentissement de l'amplification dû à l'épuisement des réactifs.

Chaque cycle comprend une rangée de 5 standards de calibration qui permet de tracer la courbe standard Ct versus Log (charge virale). La charge virale de chaque échantillon testé est obtenue à partir d'une courbe standard (gamme d'étalonnage) en inférant à partir de la courbe la charge virale correspondant à chaque échantillon.

#### **b. Mode opératoire**

- Allumer le CFX96 et l'ordinateur ;
- Centrifuger la plaque ;
- Placer la plaque dans le CFX96 ;
- Sur l'écran choisir OPEN PLATE ;
- Choisir «Plaque Gew HBV»;
- Cliquer sur OK ;
- Cliquer sur l'onglet PROTOCOL ;
- Cliquer sur SELECT EXISTING ;
- Choisir Generic HBV ;
- Puis START.

- A la fin de l'amplification, retirez la plaque de réaction optique à 96 puits du thermocycleur et la placer dans un sac plastique hermétique ainsi que les gants ayant servi à la manipulation et mettre dans la poubelle contaminée.

#### **d. Programme de l'amplification**

Effectuer le cycle de PCR en utilisant le programme d'amplification suivant, qui est achevée au bout de 2heures :

**Tableau II:** Programme d'amplification de l'ADN du VHB.

Température	Durée	Etape	Amplification
50°C	10 minutes	Régulation thermique	1 Cycle
95°C	5 minutes	Activation de l'enzyme	1 Cycle
95°C	15 secondes	Dénaturation	50 Cycles
<b>60°C</b>	<b>1 minute</b>	<b>Hybridation</b> <b>Elongation</b>	

- **Interprétation de la charge virale**

Nous avons considéré une charge virale indétectable comme toute charge virale inférieure à 80 copies UI/l ;

Nous avons considéré une charge virale faible comme toute charge virale inférieure à 2000 copies UI/l ;

Nous avons considéré une charge virale élevée comme toute charge virale supérieure à 2000 copies UI/l.

#### **4.4.2.5 Méthode utilisée pour le groupage sanguin**

Le groupage sanguin ABO/Rhésus a été effectué chez nos donneurs par la méthode d'agglutination à travers la plaque d'opaline utilisant les réactifs Anti- A, Anti- B, Anti- AB et Anti- D.

## **4.5. Variables étudiées**

### **4.5.1. Variables sociodémographiques**

Les variables sociodémographiques sont: L'âge, sexe, statut de donneurs, nombre de don

### **4.5.2. Variables biologiques**

Les variables biologiques sont : AgHBs, AgHBe, IgM anti-HBc, IgG anti-HBs, Charge virale, transaminases et le groupage sanguin ABO/Rh.

## **4.6. Technique et outils de collecte**

Nous avons recueilli les informations chez nos donneurs préalablement sur les bulletins d'analyse. Les outils utilisés étaient les registres de laboratoire et les fiches d'enquêtes. Les fiches d'enquêtes étaient remplies à partir des informations sur les bulletins d'analyse et les registres de laboratoire (**annexe 4**).

## **4.7. Analyse statistique**

Les données recueillies sur les fiches d'enquêtes ont été saisies sur **ACCESS 2002-2003** et analysées sur **STATA version 14**. Le test  $\chi^2$  a été utilisé pour comparer les proportions. Le seuil de signification a été fixé à **5%**.

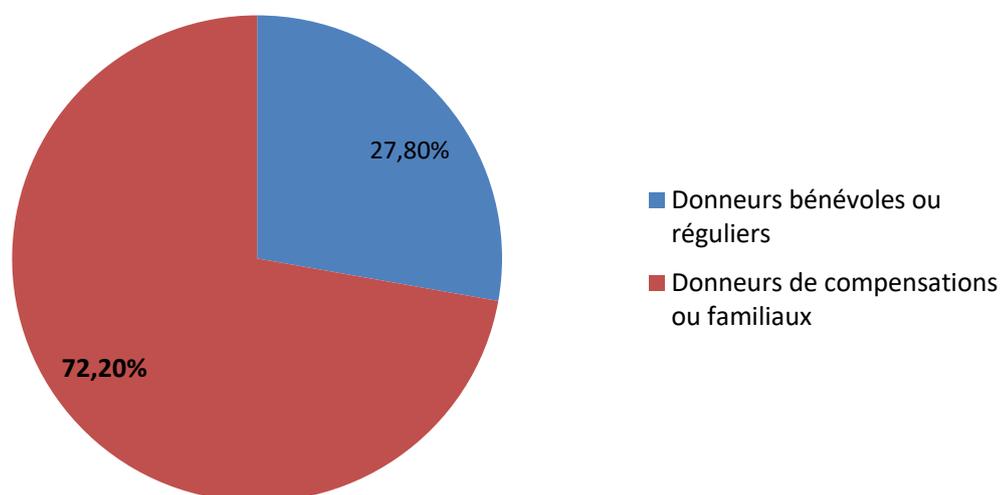
## **4.8. Aspects éthiques**

Un consentement libre et éclairé a été signé par les donneurs de sang avant le don et l'étude ne comporte aucun risque additionnel pour le donneur (**Annexe 2**). Les noms et prénoms des donneurs n'ont pas été utilisés. Seulement les numéros d'identification des poches ont été utilisés afin d'identifier les prélèvements. Le protocole a été soumis au comité d'éthique institutionnel des Facultés de Médecine d'Odontostomatologie (FMOS) et de Pharmacie (FAPH) de Bamako. L'étude s'est déroulée en respectant les règles d'éthique liées à la recherche sur les sujets humains en vigueur. Il s'agissait d'une étude d'observation sur prélèvements. Il n'y a pas eu de quantité supplémentaire de sang prélevée en dehors de la poche chez les donneurs. La collecte des échantillons biologiques, leurs manipulations et leurs traitements ont été faits selon les normes de sécurité biologique. La gestion et l'élimination des déchets biologiques ont été faites en accord avec les procédures de traitements des résidus biologiques et matières infectieuses du Mali.

## **V. RESULTATS**

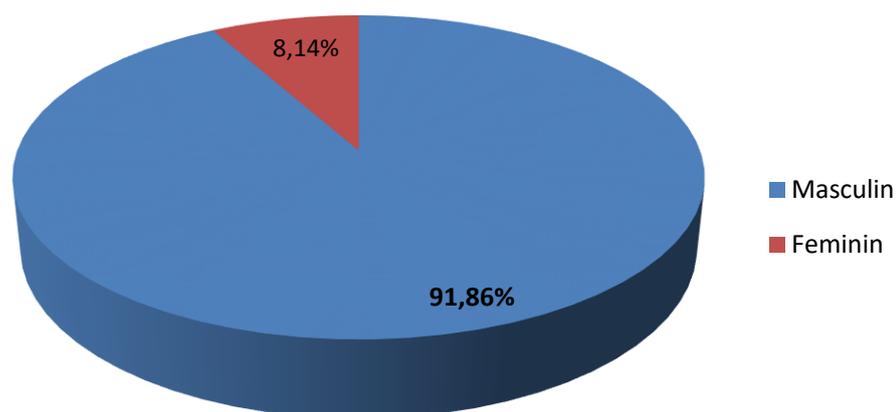
### 5.1.Socio- démographiques

La majorité des donneurs étaient des donneurs de compensation ou familiaux (72,20%).



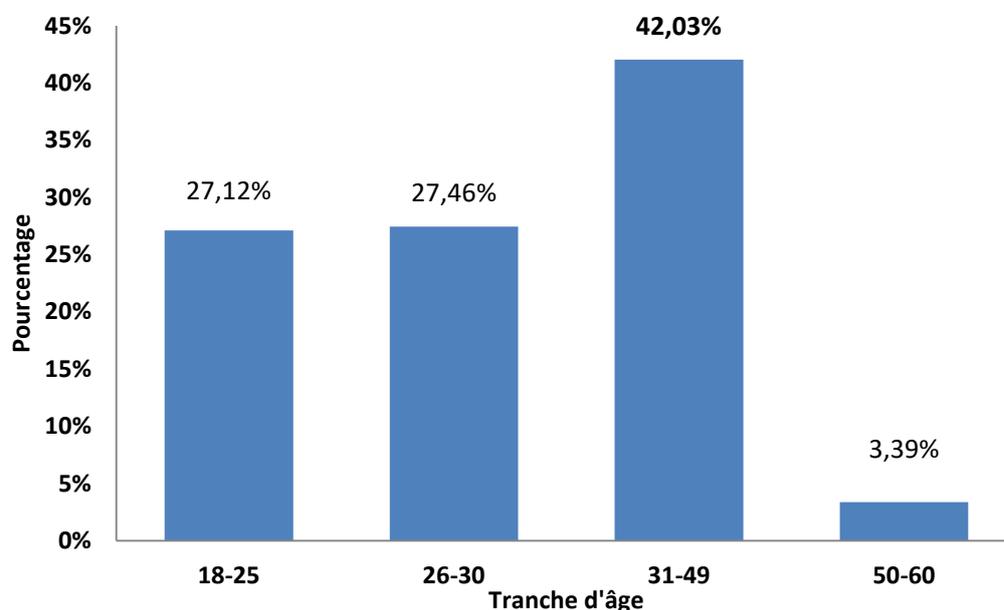
**Figure 8:**Répartition des donneurs de sang de l'étude selon le type de don.

Les donneurs de sang de l'étude étaient majoritairement des hommes. Le sex ratio était de 11



**Figure 9:** Répartition des donneurs de sang selon le sexe.

La tranche d'âge [31-49ans] était la plus représentée parmi les donneurs de l'étude porteurs de l'infection à VHB avec 42,03% et ceux âgés de [50-60ans] étaient les moins représentés avec 3,3%.



**Figure 10:** Répartition des donneurs de sang de l'étude selon la tranche d'âge

**Tableau III:** Répartition des donneurs de sang de l'étude selon le nombre de don.

Nombre de Don	Effectif	Fréquence %
<b>1</b>	<b>284</b>	<b>96,27</b>
2	4	1,36
3	6	2,03
4	1	0,34
Total	295	100

Les donneurs de notre étude étaient majoritairement (soit 96,27%) à leur premier don. Le nombre maximum de don de sang par donneur était 4.

**Tableau IV:** Répartition des donneurs de sang de l'étude selon le groupe sanguin et la nature de don.

Groupe Sanguin	Nature de don		Total n (%)
	Donneurs bénévoles N (%)	Donneurs de compensations N (%)	
A	20 (24,39)	50 (23,47)	70 (23,73)
B	24 (29,27)	64 (30,05)	88 (29,83)
AB	2 (2,44)	11 (5,16)	13 (4,41)
<b>O</b>	<b>36 (44,90)</b>	<b>88 (41,31)</b>	<b>124 (42,03)</b>
Total	82 (100)	213 (100)	295 (100)

Pearson  $\chi^2(3) = 1,1252$   $p = 0,771$

Les donneurs de sang étaient majoritairement de groupe sanguin O (42%) suivi du groupe B (30%) et du groupe A (24%). Le groupe sanguin AB était le moins fréquent (4%). Parmi les 124 donneurs de groupe sanguin O, 44,90% étaient de donneurs bénévoles et 88/124 soit 41,31% étaient de donneurs de compensation. La différence n'est pas statistiquement significative quant à la fréquence des groupes sanguins ABO selon que le donneur soit bénévole ou de compensation  $p=0,7$ . Ceci était également observé pour tous les groupes sanguins.

## 5.2. Charge virale hépatite et autres marqueurs

**Tableau V:** Fréquence des donneurs de sang porteurs de l'antigène HBs ayant une réplication virale.

Détection d'ADN	Effectif	Fréquence %
<b>Indétectable</b>	<b>92</b>	<b>31,19</b>
<b>Détectable</b>	<b>203</b>	<b>68,81</b>
Total	295	100

Il y avait 68,81% des donneurs de sang porteurs de l'antigène HBs chez qui la charge virale était détectable et 31,19% dont la charge virale était indétectables.

**Tableau VI:** Répartition des donneurs de sang selon la charge virale.

Charge virale	Effectif	Fréquence %
<b>Indétectable</b>	<b>92</b>	<b>31,19</b>
Faible	8	2,71
Elevée	195	66,1
Total	295	100

La majorité des donneurs de sang portant l'Ag HBs avait une charge virale élevée avec 66,1% des cas. Cependant 31,19% des donneurs ayant un antigène HBs positif avaient une charge virale indétectable.

**Tableau VII:** Répartition des donneurs de sang de l'étude en fonction de la présence de l'Ag HBe.

AgHBe	Effectif	Fréquence %
<b>Positif</b>	<b>22</b>	<b>7,46</b>
<b>Négatif</b>	<b>273</b>	<b>92,54</b>
Total	295	100

L'AgHBe était positif chez 7% de nos donneurs de sang alors que 93% n'étaient pas porteurs de cet antigène.

**Tableau VIII:** Répartition des donneurs de sang de l'étude en fonction de la présence des IgM anti-HBc.

IgM anti-HBc	Effectif	Fréquence %
<b>Positif</b>	<b>16</b>	<b>5,42</b>
<b>Négatif</b>	<b>279</b>	<b>94,58</b>
Total	295	100

La majorité des donneurs de sang testés 95% ne portaient pas d'IgM anti-HBc.

**Tableau IX:** Répartition des donneurs de sang de l'étude en fonction de la présence des IgG anti-HBs.

IgG anti-HBs	Effectif	Fréquence %
<b>Positif</b>	<b>37</b>	<b>12,54</b>
<b>Négatif</b>	<b>258</b>	<b>87,46</b>
Total	295	100

L'IgG anti-HBs était présent chez 12,54% des donneurs de sang.

**Tableau X:** Répartition des donneurs de sang de l'étude en fonction du niveau sérique de l'ASAT.

ASAT	Effectif	Fréquence %
<b>Normal</b>	<b>260</b>	<b>88,14</b>
<b>Elevé</b>	<b>35</b>	<b>11,86</b>
Total	295	100

Le taux de l'ASAT était normal chez 88,14 % et élevé chez 11,86% des donneurs de sang testés.

**Tableau XI:** Répartition des donneurs de sang de l'étude selon le niveau d'ALAT.

ALAT	Effectif	Fréquence %
<b>Normal</b>	<b>271</b>	<b>91,86</b>
<b>Elevé</b>	<b>24</b>	<b>8,14</b>
Total	295	100

Le taux de l'ALAT était normal chez 91,86% et élevé chez 8,14% des donneurs de sang.

**Tableau XII:** Distribution des donneurs de sang ayant un taux d'ASAT élevé en fonction de l'intensité de la charge virale de l'hépatite B.

ASAT	Charge Virale			Total
	Indéetectable n (%)	Faible n (%)	Elevée n (%)	
Normal	82(89,13)	7(87,5)	171(87,69)	260(88,13)
<b>Elevé</b>	<b>10(10,87)</b>	<b>1(12,5)</b>	<b>24(12,3)</b>	<b>35(11,86)</b>
Total	92(100)	8(100)	195(100)	295(100)

*Test exact de fisher* $p=0,58$

Le taux d'ASAT était élevé chez 12,3% des donneurs ayant une charge virale élevée ; il était de 12,5% chez ceux ayant une charge virale faible. Par contre plus de 10,87% des donneurs à charge virale indéetectable avaient un taux d'ASAT élevé. La différence n'était pas statistiquement significative quant aux taux d'ASAT entre les donneurs selon leurs charges virales de l'hépatite B  $p = 0,58$ .

**Tableau XIII:** Relation entre la charge virale et l'ALAT.

ALAT	Charge Virale			Total
	Indétectable n (%)	Faible n (%)	Elevée n (%)	
Normal	88(95,65)	7(87,5)	176(90,25)	271(91,86)
<b>Elevé</b>	<b>4(4,35)</b>	<b>1(12,5)</b>	<b>19(9,74)</b>	<b>24(8,13)</b>
Total	92(100)	8(100)	195(100)	295(100)

$p = 0,073$

Parmi les donneurs qui avaient un taux d'ALAT élevé, 4,35% qui avaient une charge virale indétectable, 12,5% qui avaient une charge virale faible et 9,74% qui avaient une charge virale élevée. La différence n'était pas statistiquement significative entre les classes de charge virale quant à la fréquence des taux élevés d'ALAT.  $p=0,07$ .

**Tableau XIV:** Relation entre la charge virale et l'AgHBe.

AgHBe	Charge Virale			Total
	Indétectable n (%)	Faible n (%)	Elevée n (%)	
<b>Positif</b>	<b>4(4,35)</b>	0(0)	<b>18(9,23)</b>	<b>22(7,46)</b>
Négatif	88(95,65)	8(100)	177(90,76)	273(92,54)
Total	92(100)	8(100)	195(100)	295(100)

$p= 0,133$

Sur les 22 donneurs présentant un AgHBe positif 9,23% qui avaient une charge virale élevée et 4% qui avaient une charge virale indétectable. Pendant qu'ils étaient porteurs de l'antigène HBe. Il y avait 90,76% des donneurs avec une charge virale élevée qui n'étaient pas porteurs de l'antigène HBe. La différence n'était pas statistiquement significative entre donneurs ayant une répllication virale et ceux qui ne sont pas porteurs de l'antigène HBe.  $p= 0,1$ .

**Tableau XV:** Relation entre la charge virale et l'IgM anti-HBc.

IgM anti-HBc	Charge Virale			Total
	Indéetectable n (%)	Faible n (%)	Elevée n (%)	
<b>Positif</b>	<b>6(6,52)</b>	<b>1(12,50)</b>	<b>9(4,61)</b>	<b>16(5,42)</b>
Négatif	86(93,48)	7(87,50)	186(95,38)	279(94,58)
Total	92(100)	8(100)	195(100)	295(100)

*Fisher exact = 0,533*

Parmi nos donneurs de sang 6,52% qui avaient une charge indéetectable, 12,5% de charge virale faible et 4,61% de charge virale élevée pendant qu'ils étaient porteurs de l'immunoglobuline IgM anti-HBc. Il y'avait 95,38% des donneurs avec une charge virale élevée qui n'étaient pas porteurs de l'immunoglobuline IgM anti-HBc. La différence n'était pas statiquement significative entre les donneurs porteurs le marqueur précoce de la réplication virale et ceux qui ne sont pas porteurs.  $p = 0,533$

**Tableau XVI:** Relation entre la charge virale et l'IgG anti-HBs.

IgG anti-HBs	Charge Virale			Total
	Indéetectable n (%)	Faible n (%)	Elevée n (%)	
<b>Positif</b>	<b>23(25)</b>	<b>3(37,5)</b>	<b>11(5,64)</b>	<b>37(12,54)</b>
Négatif	69(75)	5(62,5)	<b>184(94,35)</b>	258(87,45)
Total	92(100)	8(100)	195(100)	295(100)

*Test exact de Fisher =  $p = 0,0001$*

Il y'avait 25% des donneurs porteurs de l'immunoglobuline IgG anti-HBs qui avaient une charge virale indéetectable, 37,5% qui avaient une charge virale faible et 5,64% qui avaient une charge virale élevée. Il y'avait 94,35% des donneurs avec une charge virale élevée n'étaient pas porteurs de l'immunoglobuline IgG anti-HBs. La différence était statiquement significative entre les donneurs porteurs des IgG anti-HBs et les classes de la charge virale. L'IgG anti-HBs étant le marqueur protecteur.  $p = 0,0001$

■

# DISCUSSION

## **VI. DISCUSSION**

Cette étude a été conduite dans le but d'évaluer la charge virale de l'hépatite B chez les donneurs de sang au Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako. Pour cela nous avons adopté une méthodologie qui consiste à recruter au hasard les donneurs de sang porteur de l'antigène HBs qui ont accepté de donner leur consentement écrit. Au total 295 donneurs de sang porteur de l'antigène HBs ont été inclus.

### **6.1. Caractéristiques sociodémographiques**

Les donneurs de sang porteurs de l'AgHBs positif étaient en majorité des donneurs de compensations (La figure 13) ce qui correspond bien à la situation du don de sang au Mali. En effet depuis des décennies le CNTS a élaboré une politique de fidélisation des donneurs afin d'avoir 100% de donneurs bénévoles. A présent cet objectif est loin d'être atteint car la majorité des donneurs de sang sont des donneurs de compensation. Cette situation n'est pas favorable à la sécurité transfusionnelle, car il a été décrit que les infections transmissibles par le sang étaient plus fréquents chez les donneurs de compensation que ceux bénévoles selon *Diarra et al.* en 2009 [26]. Les donneurs étaient majoritairement des hommes avec un sex ratio de 11 (figure 14). Ce ratio est supérieur à celui décrit par *Traoré* en 2014 au Mali [27] qui avait trouvé que les hommes étaient 5 fois plus nombreux que les femmes. Habituellement, parmi les donneurs de sang en Afrique, les hommes sont plus nombreux que les femmes. En effet *Kra et al.*, en Côte d'Ivoire en 2006 avaient également observé un sex ratio de 5,7 [28]. Le fait qu'il y ait moins de donneurs féminins pourrait s'expliquer par la présence de certaines contre-indications spécifiques à la femme qui sont entre autre : la grossesse, l'accouchement, l'allaitement depuis moins de 6 mois et la période des menstrues. Mais la différence de sex ratio que nous avons dans notre étude est probablement due à un biais de sélection lié au mode de recrutement des donneurs porteurs de l'antigène HBs.

La tranche d'âge de [31- 49ans] était la plus représentée avec 42% (figure 15). Plusieurs études en Afrique et en Europe ont montré que le portage de l'antigène HBs était plus fréquent chez les adultes jeunes : 16-39ans au Ghana selon *Ofori-Asenso et al* en 2016 [29] et 30-39ans soit (34,8%) au Kosovo selon *Fejza et al* en 2009 [30].

La majorité de nos donneurs étaient à leur premier don avec 96% de cas (tableau III). Cependant un nombre non négligeable avaient donné au moins 4 fois le sang. Ceci indique qu'il faut continuer à dépister les hépatites virales chez les donneurs de sang à tout moment quel que soit le nombre de don afin de réduire le risque de transmission des hépatites par transfusion sanguine.

Nous avons cherché à savoir s'il y avait un lien entre le groupe sanguin ABO et le portage de l'antigène HBs. Dans notre échantillon il n'y avait pas de différence de fréquence plus élevée d'un groupe sanguin par rapport aux autres comme décrit par *Siransy et al.* en Cote d'Ivoire en 2015[31]. Nos résultats sont comparables à la distribution chez les donneurs de sang décrit par plusieurs auteurs au Mali en 2012 par *DIABATE* et *DOUYON* [32,33]. Ils sont également comparables à ceux de *Pourhassan* au Pakistan en 2014 [34].

## **6.2. Caractéristiques des marqueurs viraux de l'hépatite B**

La charge virale était détectable chez environ 68,81% et non détectable chez 31,19% de donneurs de sang ayant un antigène HBs (tableau V). Parmi ceux qui avaient une charge virale détectable 66,1% avaient une charge virale élevée alors que 2,71% avaient une charge virale faible (tableau VI).

Quant aux autres marqueurs de l'hépatite B, nous constatons que 7,46% des donneurs porteurs de l'antigène HBs étaient également porteurs de l'antigène HBe (tableau VII), 5,42% portaient des IgM anti-HBc (tableau VIII) et 12,54% avaient des IgG anti-HBs (tableau IX).

Les transaminases ALAT et ASAT étaient élevées chez respectivement chez 8,14% et 11,86% des donneurs de sang ayant l'antigène HBs (tableaux XI et X). L'activité enzymatique des ALAT est élevée dans le sang en cas de lyse des cellules du foie (cytolyse) et c'est le cas lors des hépatites, qu'elles soient virales ou d'autres origines. Par contre l'ASAT est une enzyme dont l'activité est plus élevée dans les muscles et le cœur. Parmi les donneurs de sang ayant une antigénémie HBs et un taux d'ALAT élevé, 9,74% qui avaient également une charge virale élevée ce qui indique que ceux-ci avaient une hépatite évolutive. Il aurait été intéressant d'évaluer l'état du foie chez ces donneurs. Ce qui n'était pas prévu dans cette étude. Nos résultats sont comparables à ceux de *Zawde* .et *Sisay* qui avaient observé chez les donneurs de sang en Ethiopie 2015 que 9% étaient porteurs d'antigène HBs et d'un taux élevé d'ALAT[35].

Au cours de notre étude 7,46% de nos donneurs de sang étaient porteurs de l'AgHBe (tableau VII) ce marqueur est le témoin de la réplication du virus et démontre la phase la plus contagieuse et nécessite une prise en charge rapide des porteurs de cet antigène. Ce résultat est inférieur à celui de *Sidibé* au Mali en 1981 [36], qui avait trouvé 9,4% de porteurs de l'AgHBe dans la population malienne.

Les donneurs de sang de notre étude étaient porteurs de l'anticorps anti-HBc, dans 5% de cas (Tableau XV) marqueur précoce de la réplication virale en indiquant le degré de l'infection. Ce résultat est nettement inférieur à celui de *Sidibé* [36] qui a trouvé 69% de cas au sein de la population générale au Mali.

Parmi les 92 donneurs porteurs de l'AgHBs positif qui avaient une charge virale indétectable, 5 avaient un taux d'ALAT élevé sans antigène HBe et d'IgM anti-HBc. Parmi ceux-ci il y avait 3 donneurs porteurs d'IgG anti-HBs ce qui suggère que ceux-là avaient des anticorps protecteurs et que la présence d'antigène HBs indiquait simplement un contact avec le virus qui a été contrôlé par le système immunitaire.

Parmi les 92 donneurs chez qui il n'y avait pas d'ADN viral, quatre étaient porteurs d'antigène HBe dont un seul avait des IgG anti-HBs. Ce dernier est probablement quelqu'un dont le système immunitaire a permis de contrôler le virus alors que les 3 autres sont des donneurs chez qui le virus se multiplie mais la virémie n'a pas encore atteint le seuil de détection de la méthode utilisée.

Sur les 92 donneurs dont la charge virale de l'hépatite B n'était pas détectable 88 n'avait pas également d'antigène HBe. Parmi ces derniers 5 avaient cependant un taux d'ALAT élevé. L'on peut considérer que ces donneurs avaient une hépatite non virale probablement médicamenteuse ou alcoolique. Les 88 donneurs sans AgHBe sont probablement des donneurs sans infection virale par le VHB. Ce résultat indique qu'un nombre important de poches de sang sont éliminés pour la présence d'antigène HBs alors qu'elles ne contiennent pas réellement de VHB.

Des études ont montré la limite de l'utilisation de l'antigénémie HBs pour valider les dons de sang. En effet des cas d'hépatites occultes ont été décrits comme ayant l'antigène HBs négatif alors que l'ADN viral est positif *Keechilot et al en 2016 et : Karimi et al en 2016* [37,38].

Le tableau XVI indique que 5,64% des donneurs de sang avec AgHBs avaient une charge virale élevée et étaient également porteurs des IgG anti-HBs. Ces donneurs étaient progressivement en phase chronique et contrôlaient avec le temps le virus car possédant les anticorps protecteurs. Par contre 23 donneurs de sang étaient porteurs de l'anticorps IgG anti-HBs à des titres élevés et n'avaient pas de charge virale détectable. L'IgG anti-HBs étant un marqueur de protection, ceci nous laisse croire que ces donneurs ont été immunisés et ne présentent pas de risque de transmettre l'hépatite virale B donc il n'était pas nécessaire d'éliminer leurs poches bien au contraire les anticorps présents dans leur plasma auraient conférer une immunité passive contre le VHB chez les receveurs.

Ces résultats nous amènent à suggérer au CNTS de vacciner les donneurs de sang notamment volontaires et régulier afin de sécuriser cette source potentielle de leur matière première.

Il a été décrit des cas d'hépatites occultes chez les donneurs de sang qui ont l'ADN viral mais n'expriment pas l'Antigène HBs selon *Kiel et al* en 2014 [39]. Ceci pose la difficulté de dépistage de l'hépatite B chez les donneurs de sang par les techniques sérologiques. Il serait donc intéressant d'évaluer les valeurs diagnostiques du dépistage du génome viral chez les donneurs de sang afin de renforcer la sécurité transfusionnelle. En effet certains travaux ont montré que le dépistage de l'ADN viral serait d'un apport à la sécurité transfusionnelle dans les pays où cela serait disponible selon *Kuhns et al* en 2006 [40].

Par ailleurs les études génomiques ont décrit 9 génotypes différents (A-I) du virus de l'hépatite B dans le monde selon *Kramvis* en 2014 [41]. En Afrique de l'Ouest le génotype E est le plus fréquent selon *Andemach IE. et al.* en 2013 et *Zehender et al* en 2014 [42,43] Ces génotypes comportent plusieurs sous-types. Ces génotypes et sous-types diffèrent dans leur distribution géographique, leurs voies de transmission, l'évolution clinique, la réponse au traitement antiviral et leur pronostic clinique selon *Kramvis A.* en 2014 et *Croagh CM. et al.* en 2015 [41,44]. Dans notre étude nous n'avons pas pu déterminer les génotypes des virus, cependant il est prévu de d'effectuer le génotypage d'environ 10% des prélèvements contenant de l'ADN du virus de l'hépatite B dans le cadre d'un partenariat avec l'Université Catholique de Lyon en France.

## **VII. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### **7.1. Conclusion**

La charge virale de l'hépatite B était détectable chez 68,81% et non détectable chez 31,19% des donneurs de sang chez qui l'antigène HBs était positif au CNTS de Bamako. La charge virale était élevée chez 66,1% des donneurs de sang ayant l'antigène HBs. Les autres marqueurs de l'hépatite B étaient présents chez 7% pour l'antigène HBe, 5% pour les IgM anti-HBc. Douze pourcent de ces donneurs porteurs de l'antigène HBs avaient des IgG anti-HBs protecteurs

### **7.2. RECOMMANDATIONS**

- **Aux Chercheurs**

Continuer cette étude en typant les Virus de l'hépatite B afin de déterminer la fréquence des génotypes.

- **Au Centre National de Transfusion Sanguine**

Favoriser la mise en place le dosage des anticorps totaux (IgM anti-HBc et IgG anti-HBc) chez les donneurs de sang.

Mettre en place un protocole de recherche permettant d'évaluer l'AgHBs et l'ADN viral chez les donneurs de sang en fin de déterminer les hépatites occultes.

- **Au Ministère de la santé et de l'Hygiène Publique**

Développer des stratégies de réduction de la transmission du virus de l'hépatite B dans la population au Mali.

Créer un Programme National de Lute contre le virus de l'hépatite B au Mali.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **Marcellin P ZJ.**  
Les virus des hépatites B et Delta. Les virus transmissibles par le sang. In: Birand P. (éd). Montrouge-Londres-Rome. John Libbey Eurotext, 1996: 53-75
2. **WHO.** prevention and control of viral hepatitis: framework for global action 2012. Geneva: WHO 2012 ( [www.who.int\(csr\) disease/hepatitis/ GHP framework](http://www.who.int(csr) disease/hepatitis/ GHP framework)) Accessed 14 (consulté le 30/09/2016).
3. **OMS.**  
Hépatite B (Internet) [hpp/Hépatite Info.Service.Org.com](http://hpp/Hépatite Info.Service.Org.com) (consulté le 22/02/2016).
4. **Mohsen A. H., Asterbrouk E, Taylor P, C. B. & Norris, S.**  
(2002) Hepatitis C and HIV-1 coinfection. Gut, 51: 601-8.
5. **Koné M.C, Sidibé E.T, Malle K.K, Beye S.A, Lurton G, Dao S .D.M. et al.**  
Séroprévalence des virus de l'immunodéficience humaine et des hépatites B et C chez les donneurs de sang à Ségou (Mali). Med Sante Trop 2012 ; 22 ; 1 :97-98.
6. **Tangara O.**  
Co-infection hépatite B et Hépatite C chez les donneurs de Sang au CNTS de Bamako. Thèse Med. Bamako 2004. 61p, n °4.
7. **Dembélé N.** Séroprévalence de l'infection par le VHB chez les scolaires âgés de 15 à 25 ans à Bamako, Koulikoro et à Sikasso. Thèse Med. Bamako 2006. 41p, n°6.
8. **Guindo O.**  
Infection à VIH et à VHB chez les donneurs de sang au CNTS de Bamako. Thèse Med. Bamako 2003. 47p, n°03.
9. **Josiane P., Syria L et al.**  
Surveillance des marqueurs d'une infection par le VIH, HTLV, et les virus des hépatites B et C chez les donneurs de sang en France. Bulletin épidémiologique hebdomadaire n° 46. 2001;
10. **Maléki Assi H.**  
Diagnostic simultané des virus des hépatites B, C et du VIH par PCR multiplex en temps réel chez les donneurs de sang à Lomé. Memore 2012.
11. **Pilly E.**  
Maladies infectieuses et tropicales. 21<sup>ème</sup> éd. Paris : Alinéa plus et CMIT 2012.
12. **Wikipedia.**  
Vaccin contre l'hépatite B et Sclérose. Disponible à partir de [http//contraverses science-po-fr/archive/hépatit b/ word press / index-21548.html](http://contraverses science-po-fr/archive/hépatit b/ word press / index-21548.html) (consulté le 05/05/2016).

13. **O.M.S.**

Soixante Troisième Assemblée Mondiale de la santé. Les Hépatites. In. Available from: [http/ WWW.Oms.com](http://WWW.Oms.com) (consulté le13/03/2016)

14. **Cohen P.**

Les hépatites Virales. Revue de presse médicale1999; 28 :p280-305

15. **Eugene C.**

Les Hépatites Virales. Paris: Maisson 2000.

16. **Catrice M.**

Prévention de l'hépatite B dans les populations migrantes originaires de zone de forte épidémie : Afrique Subsaharienne et Asie. Thèse de Médecine, Université de Paris VII, 2009

17. **POL S. Fontaine H.**

Hépatites virales. Encycl Méd Chir 1998, 22 p

18. **Charnay P, Mandant E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P and Galibert F.**

Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). Nucleic Acids Res. 1979 ; 7: 335-346.

19. **Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, Mackay P. Lead better Grand Murray.**

Hepatitis B virus genes and their expression in E. coli. 1979; 282: 575-57.

20. **Momme J.M et Coll.**

Mise au point : Vaccination prophylactique contre l'hépatite B : Actualité et avenir. Gastro-entérol Clin et Biol 1999; 23: 452-463.

21. **Fleury H.J.A.**

Abrégé de virologie. Masson, Paris; 1997. p. 191.

22. **Rabe B, Vlachou A, Pante N, Helenius A, Kann M.**

Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the virale genome. Proceedings of the National of Sciences of the United States of America100, 2003: 9849-9854

23. **Trepo C.**

Virus des Hépatites B. Rev, 1995; 45: 161-7

24. **Chevaliez S, Pawlosky JM.**

Virological tests in hepatitis B and C. Hépato-Gastro 2008; 15: 345-353

25. **Koné K.**

Coïnfection VIH/VHB au CESAC de Bamako et USAG de la commune V. Thèse de

Méd. Bamako 2010

26. **Diarra A, Kouriba B, Baby M, Murphy E, Lefrere JJ.**  
HIV, HCV, HBV and syphilis Rate of positive donations among blood donations in Mali: lower rates volunteer blood donors. *Transf Clinet Biol*, 2009; 16: 444-447
27. **Traoré H.**  
Etude comparative de la Séroprévalence des marqueurs VIH, VHB, et VHC des dons de sang en collectes fixes et mobiles. Bamako; Thèse Med 2014.
28. **Kra O, N'Dri N, Ehui E, Ouattara B, Bissangnene E.**  
Prévalence de l'antigène HBs chez les donneurs de sang au centre régional de transfusion sanguine de Bouaké en 2001. *Bull Soc Pathol Exot* 2007 ; 100 ; 2 : 127-129.
29. **Ofori-Asenso R, Agyeman AA.**  
Hepatitis B in Ghana: a Systematic review et meta-analysis of prevalence studies *BMC infect Dis* 2016 ; 18: 126-130;
30. **Fejza H, Telaku S.**  
Prevalence of HBV and HCV among blood donors in Kosovo. *Virol J*, 2009; 13; 6: 21
31. **Siransy L.K, Nanga Z.Y, Zaba F.S, Tufan N.Y DSR.**  
ABO/Rh Blood Groups and Risk of HIV infection and Hepatitis B Among Blood Donors of Abidjan, Cote D'Ivoire *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2015;
32. **Diabaté D.**  
Etude de l'infection par le HTLV-1 chez les donneurs de sang et les malades polytransfusés à Bamako-Mali . Thèse Med. 2012.
33. **Douyon I.**  
Risque de l'infection à plasmodium et efficience de son dépistage par le test rapid Opti-MAL-IT chez les donneurs de sang de Bamako-Mali .Thèse Pharm. 2012.
34. **Pourhassam A.** Association between ABO blood/rhesus grouping and hepatitis B and C: a case control study. *Pak J Biol sci*: 2014;
35. **Zawde D, Sisay Y.**  
National blood requirement, serum ALT and hepatitis in Ethiopian blood donors. *Ethiop Med J*. 1991: 15-20.
36. **Sidibé S.**  
Marqueurs sérologiques de l'hépatite B au Mali : Thèse : Med Bamako 1981.
37. **Keedchilot C.S, Shenoy V, Kumar A, Briswas L, Vijayrajratnam S, Dinesh K Nair P.**  
Detection of occult hepatitis B and Window period infection among blood donors by individual donation nucleic acid testing in a tertiary care center in South India.

Pathog Glob Health. 2016;

38. **Karimi G, Zadsar M, Vafaei N, Spharifi Z, Falah Tafti M.** Prevalence of antibody to Hepatitis B core antigen and hepatitis B virus DNA in HBsAg negative healthy blood donors. *virol J.* 2016;
39. **Kiely P, Margaritis AR, Seed CR YH.** Australian Red cross blood Service NAT Study Group : *Transfusin.* 2014 Aug; 54; 8: 2084-91
40. **Kuhns MC Busch MP.** New Strategies for blood donor Screening for hepatitis B virus: Nucleic acid testing versus immunosassay methods. *Moldiagn Ther.* 2006; 10; 2: 77-91
41. **Kramvis A.** Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirol.* 2014; 57: 141-150.
42. **Andemach IE, HuneWald OE Muller CP.** Bayesian inference of the evolution of HBV/E. *PLoS ONE* 2013; 8; 81: 690
43. **Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Sorrentino C, Lo Presti A, Tanzi E, Ciccozzi M. Galli M.** Enigmatic origin of hepatitis B Virus: An Ancient travelling companion or a recent encounter *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7622-7634.
44. **Croagh CM, Desmond PV. Bell SJ.** Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance *World Hepatol* 2015; 7: 289-303.
45. **Schneider V.** Quantification génomique: applications aux infections par le virus de l'immunodéficience humaine(HIV). *Revue Française des Laboratoires* 2003; 351: 31-34

## ANNEXES

### ANNEXE 1 :

#### QUESTIONNAIRE MEDICAL

Collecte fixe: /\_\_\_/, Mobile : /\_\_\_/, si mobile, lieu :.....

#### Interrogatoire et examen clinique du candidat donneur

(CNTS, Bamako)

Le secrétaire doit expliquer au donneur de remplir cette fiche s'il peut, sinon elle lui dit de la remettre au médecin qui l'aidera à la remplir.

Prénoms et Noms :.....Age :.....

Profession :.....Adresse : .....

Questions	Oui	Non	Commentaires
Le candidat donneur a – t – il déjà donné son sang ? Si oui, précisez date du dernier don			
Le candidat donneur a – t – il lui-même reçu des transfusions (polytransfusés) ?			
Le candidat donneur a – t – il été opéré ou subi un examen endoscopique récemment ?			
Le candidat donneur souffre – t- il de troubles physiologiques graves (cardio-vasculaires, pulmonaires, digestifs, rénaux, nerveux ...) ?			
Le candidat donneur a – t –il déjà développé la jaunisse ?			
Le candidat donneur est – il en convalescence ou prend – t – il des médicaments Si oui, lesquels			
S'il s'agit d'une candidate, est – elle en état de grossesse, ou allaite – t – elle un enfant, est – elle en menstruation ?			

Le candidat a – t – il été vacciné, reçu du sérum ou subi une cure de désensibilisation récemment ? Si oui, précisez			
Le candidat a-t-il eu une maladie vénérienne (MST) ou été en traitement pour une telle maladie ?			

**Avez – vous un comportement à risque, notamment :**

Questions	Oui	Non	Commentaires
Avez – vous pris ou prenez – vous de la drogue ?			
Avez – vous plus d’un partenaire sexuel (*) ?			
Votre partenaire est – il séropositif (*) ?			
Avez- vous des raisons de penser que votre partenaire a des comportements à risque (*) ?			

(\*) Rapports avec ou sans préservatif.

**Si vous répondez OUI à l’une de ces questions, NE DONNEZ PAS**

Examen clinique sommaire du candidat donneur	<b>T.A</b> _____ : ..... <b>Poids</b> : .....kgs  <b><u>Commentaires</u></b> :
--	--

## Déclaration

Je donne l'autorisation au Centre National de Transfusion Sanguine de prélever mon sang. J'ai reçu l'information sur le SIDA. J'ai compris l'information sur la transmission du virus du SIDA (HIV) par transfusion de sang ou de plasma.

Je ne me considère pas comme une personne ayant des comportements à risque. Dans le cas contraire, je ne donnerais ni sang, ni plasma à des fins transfusionnelles ou préparations complémentaires. Je sais que mon sang sera soumis à un test de dépistage du SIDA et d'autres marqueurs de maladie. Les renseignements que je fournis sont, pour autant que je puisse en juger, exacts et complets.

### **Signature du donneur ou Empreinte digitale**

Donneur examiné et interrogé par :

N°prélèvement

Initiales : .....

<b>Décision du médecin</b>	<b>Cocher une des 2 réponses</b>
<b>Apte</b> à donner son sang	
<b>Inapte</b> au don de sang (préciser le motif)	

**Signature**

## ANNEXE 2 :

### FORMULAIRE DE CONSENTEMENT LIBRE ET ECLAIRE

**Titre de l'étude** : Etude de la charge virale de l'hépatite B chez les donneurs de sang à Bamako, Mali.

Chercheur : \_\_\_\_\_

Sites : CNTS, Bamako (Mali)

Nom et Prénom du participant \_\_\_\_\_

Numéro de dépistage du participant : \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_ Age \_\_\_\_\_ années Sexe : \_\_\_\_\_

Résidence \_\_\_\_\_

#### Invitation

Nous sollicitons votre participation à une étude conduite par le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux du Mali et le Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako, financée par la Fondation Mérieux en France. Au préalable il est important que vous ayez connaissance de certains éléments importants avant que vous preniez toute décision concernant votre participation à l'étude :

- Votre participation à cette étude est entièrement volontaire.
- Vous pouvez vous retirer de l'étude à tout moment sans aucune perte de bénéfices auxquels vous aurez droit en dehors de l'étude. Si vous prenez une telle décision, nous vous prions d'informer un membre de l'équipe.

#### But de l'étude

Le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux a développé une unité de mesure de la charge virale.

Au Mali, à présent, nous ne disposons pas de données épidémiologiques issues d'une méthodologie satisfaisante sur la fréquence du portage réel du virus des hépatites B. En plus, les donneurs de sang dépistés séropositifs sont orientés vers les cliniciens et le département de médecine traditionnelle de l'INRSP pour leur prise en charge. Nombre de ces donneurs sont traités surtout traditionnellement sans mesure de la charge virale. Voilà pourquoi nous voulons mener cette étude pour évaluer la charge virale et les caractéristiques génotypiques des virus des hépatites B chez les donneurs de sang. A terme nous souhaitons renseigner le CNTS et les autorités sanitaires sur le portage du VHB chez les donneurs de sang. Nous vous sollicitons pour participer à cette étude.

## Procédures

Vous pouvez participer à cette étude, si vous êtes  
donneur de sang au CNTS  
en bonne santé  
entre 18 et 60 ans

Vous ne pouvez pas participer à cette étude si vous n'êtes pas en bonne santé, sur la base de l'examen clinique du Centre National de Transfusion Sanguine

Etes-vous en état de grossesse ? et /ou allaitante ou en période de menstruation ?  
(s'adresse aux femmes)

avez –vous moins de 55Kg ?  
en état de convalescence ?

Pour voir si vous êtes apte à donner du sang, nous vous : poserons des questions sur votre état de santé actuel et sur vos antécédents médicaux et chirurgicaux examinerons sommairement sur le plan clinique

Cet examen ne doit pas prendre plus d'1 heure. Tous les résultats des analyses et leurs significations, vous seront communiqués et expliqués si vous le désirez après l'analyse de sang.

S'il est prouvé que vous êtes malade au cours du dépistage, nous ne vous fournirons pas de soins, mais vous serez référés aux structures adéquates de prise en charge.

Un total de 1000 donateurs de sang sera inclus dans cette étude. Nous prélèverons 1 ml de sang de la poche de sang que vous avez donnée si le test sérologique montre un résultat positif et vous ne serez plus prélevé au cours de cette étude. A partir de ce sang nous procéderons au dépistage et à la mesure de la charge virale de l'hépatite B.

Une partie du sang prélevé pourrait être gardée longtemps avec son numéro d'étude afin de pouvoir faire des analyses supplémentaires dans le futur en relation avec les hépatites, que nous ne connaissons pas encore ; dans ce cas nous demanderons l'autorisation du Comité d'Ethique des Facultés de Médecine d'Odontostomatologie et de Pharmacie. Les prélèvements de sang seront gardés au niveau du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux du Mali. Le sang prélevé sera utilisé uniquement pour la recherche. En acceptant de participer à cette étude, vous acceptez que votre sang soit stocké pour la recherche. Si vous changez d'avis en ce qui concerne le stockage

de votre sang, veuillez informer au moins un des chercheurs indiqués dans ce document de consentement.

#### La durée

Un maximum de 6 mois.

#### Les risques

Les risques potentiels pour les sujets comprennent ceux qui sont associés à la prise de sang et à une perte éventuelle de confidentialité. Les risques associés au prélèvement de sang sont rares et incluent la contusion, la saignée, l'infection et l'évanouissement. Nous nettoierons le creux du bras avec une solution antiseptique (alcool à 70°) lors des prélèvements de sang et nous utiliserons des aiguilles stériles pour les prélèvements. Nous pratiquerons les bonnes pratiques de laboratoire et clinique pour minimiser ces risques. Tous les échantillons et les renseignements relevant de l'étude seront codés.

#### Les bénéfices

Vous ne recevrez pas un bénéfice direct de cette étude. Cependant, le résultat d'analyse permettra de vous suivre efficacement en cas de portage réel du virus de l'hépatite B ou de vous rassurer en cas de résultat négatif. Seulement, comme d'habitude, si vous acceptez d'être un donneur volontaire régulier, vous bénéficierez :  
de dons de sang gratuit si vous ou un de vos parents se trouve dans les nécessités  
d'une consultation et des analyses de sang réalisables au CNTS

#### La compensation

Vous ne recevrez pas de compensation au cours de cette étude pour le temps perdu pendant la visite.

#### La participation volontaire

Vous avez le droit de refuser de participer à cette étude et de vous retirer à tout moment.

#### La confidentialité

Les échantillons collectés seront codés. Votre nom ne sera utilisé dans aucun rapport et les informations spécifiques que nous obtiendrons de vous ne seront pas partagées avec une tierce personne, excepté les investigateurs de l'étude.

#### Le stockage

Nous allons conserver le reste des échantillons pendant 3 ans au cas où nous souhaiterions faire des tests additionnels dans le futur. Vous avez le droit de refuser que vos échantillons soient conservés. Vous pouvez demander que ces échantillons soient détruits à n'importe quel moment. Sachez qu'aucune étude future ne peut être réalisée sur vos échantillons sans une approbation du comité d'éthique des Facultés de Médecine d'Odontostomatologie et de Pharmacie.

Êtes-vous d'accord pour qu'on conserve vos échantillons?  Oui  Non

#### Les contacts

Avez-vous des questions d'éclaircissement sur votre participation à cette étude ? Si oui, vous pouvez contacter un des membres de notre équipe ou les personnes suivantes: Pr Bourèma KOURIBA, Tel 66 75 37 28, ou Dr Amadou Diarra Tel: 20 21 39 58 ou 66 76 11 64 ou Pr. Marouf Kéita, Président du Comité d'éthique de la FMOS BP 1805, Tél: (223) 222 52 77, Cellulaire : 76 46 86 28 Bamako – Mali.

L'équipe de recherche m'a expliqué les procédures ; j'ai eu suffisamment de temps pour poser mes questions et les réponses à mes questions ont été satisfaisantes. J'ai compris que ma participation à l'étude est volontaire et que je peux décider de quitter l'étude à n'importe quel moment. Si vous êtes d'accord pour participer à cette étude veuillez apposer votre empreinte digitale au bas de la page (comme vous le faites lors de la confection d'une carte d'identité).

\_\_\_\_\_  
digitale ou Signature du tuteur

\_\_\_\_\_  
Date

Empreinte

\_\_\_\_\_  
Signature du chercheur

\_\_\_\_\_  
Date

Pour les volontaires illettrés: j'ai témoigné pour le consentement informé et j'atteste que le volontaire a été informé de tous les détails des risques et bénéfices de l'étude et a reçu les réponses à toutes les questions posées.

Nom du témoin : \_\_\_\_\_

Nom

Prénoms

\_\_\_\_\_

Signature du témoin

Date

### **ANNEXE 3 :**

LETTRE D'INFORMATION AU participant à l'étude

CHERCHEUR PRINCIPAL : Pr Bourèma KOURIBA

Madame, Monsieur,

Vous êtes invité(e) à participer à une étude de recherche scientifique sur « l'évaluation de la charge virale de l'hépatite B chez les donneurs de sang à Bamako- mali».

Avant de décider de participer à cette étude, il est important d'en comprendre l'objectif ainsi que ses implications. Prenez le temps de lire attentivement les informations suivantes et d'en discuter avec vos proches. Si toutefois certains points manquent de clarté ou si vous avez besoin d'informations complémentaires, n'hésitez pas à en parler avec le chercheur principal ou un membre de l'équipe. Vous pouvez prendre tout le temps nécessaire pour décider si vous souhaitez participer ou non à l'étude.

Vous trouverez ci-après des informations sur cette étude, sur votre rôle dans cette étude, sur les risques, les contraintes et les bénéfices liés à votre éventuelle participation à cette étude ainsi que sur la procédure de consentement.

Si vous décidez de participer à cette recherche, il vous sera demandé de signer un formulaire de consentement. Cette signature confirmera que vous êtes d'accord pour participer à cette étude.

Quel est l'objectif de l'étude ?

Le but de cette étude est de contribuer à l'amélioration de la sécurité transfusionnelle et de la prise en charge des donneurs de sang porteurs du virus de l'hépatite B.

Comment se déroulera l'étude ? Quel sera votre rôle ?

L'étude porte sur 290 donneurs de sang porteurs et 10 non porteurs de l'antigène HBs (une particule du virus de l'hépatite B). Vous donnerez 10ml de sang pour la détermination de la charge virale.

Quels sont les contraintes et les risques liés à l'étude ?

La principale contrainte de l'étude est d'accepter un prélèvement de sang, de 10 ml, conservé, puis utilisé à des fins de recherche. Toutes les investigations qui seront réalisés dans les laboratoires seront à la charge des investigateurs et cela ne vous coûtera rien.

Combien de temps durent l'interview?

En fonction de votre rapidité à répondre aux questions, il faut compter environ 1 heure. Ce temps dépendra de vous et nous pouvons moduler ce temps en fonction de votre disponibilité.

Quels sont les bénéfices attendus ?

Cette étude présente un bénéfice direct pour les participants qui s'y prêtent. Car la présence du virus dans leur organisme sera précisée par le test ce qui permettra une meilleure prise en charge par un médecin.

Droit de refuser ou de se retirer de l'étude

Votre participation à cette étude est totalement volontaire et vous êtes libre de refuser de participer à l'étude ou de l'interrompre à tout moment sans avoir à vous justifier et sans aucun préjudice.

Si vous acceptez de participer à l'étude, il vous sera demandé de signer un consentement de participation avant toute intervention dans le cadre de l'étude. La signature du formulaire de consentement n'affecte aucunement vos droits légaux.

L'investigateur peut interrompre à tout moment votre participation à l'étude s'il estime que les procédures de l'étude ne sont pas respectées, ou pour des raisons administratives ou autres.

Votre participation à ce projet et les données recueillies vous concernant resteront strictement confidentielles.

Vos données seront utilisées pour cette étude et les publications qui en découleront, sous une forme anonyme et codée. Votre identité ne sera jamais révélée.

Pour toute question relative à cette étude, vous pouvez contacter le

☎ Professeur Bouréma KOURIBA tél : 66.75.37.28 ou 20.22.51.54

L'investigateur :

Le Participant :

Nom : .....

Nom : .....

Prénom : .....

Prénom : .....

Date : .....

Date : .....

Signature :

Signature :

Si vous acceptez de participer à cette étude, merci de compléter et de signer le formulaire de recueil de consentement. Vous conserverez cette note d'information que vous pouvez communiquer à qui de droit

Fait en 2 exemplaires originaux, datés et signés.

Un exemplaire conservé par la personne donnant son consentement

Un exemplaire conservé par le responsable du programme

**ANNEXE 4 :**

FICHE DENQUETE

N°ID :

DATE :

Nom, Prénom : .....N° de Prélèvement : .....

Sexe :  {1= Masculin, 2= Féminin}

Age :

Résidence habituelle : .....Tél : .....

Type de don :  {1= Volontaire bénévole, 2= Familial}

Nombre de Dons :

Situation matrimoniale:  = Marié(e); 2=Célibataire; 3=Divorcé(e);Veuf (ve)}

Groupes sanguins : ABO..... RhD  {1=positif ; 2=négatif}

Taux de CRP/..... VN:(6mg/L)

Transaminases: GOT: .....VN: (H: 8- 30 UI/L) (F: 6 – 25 UI/L)

GPT: .....VN: (H: 8- 35 UI/L) (F: 6 – 25 UI/L)

AgHBS {1=positif ; 2=négatif}

Valeur DO : .....

Valeur seuil : .....

AgHCV {1=positif ; 2=négatif}

Valeur DO : .....

Valeur seuil : .....

Charge virale :  {1= Oui ; 2= Non} Valeur .....log.....

## **ANNEXE 5 :**

Mode opératoire simplifié de Monolisa® Ag HBs ULTRA :

Distribuer 100µl de control négatif R3 dans les puits A1, B1, C1 et D1

Distribuer 100µl de contrôle positif R4 dans le puits E1

Distribuer 100µl d'échantillon dans les autres puits à partir de F1, G1...

Ajouter 50µl de conjugué dans tous les puits et mélanger

Incuber à 37°±1 pendant 1H30mn

Laver avec le programme T2N5 BO.5s 800µl

Distribuer 100µl de substrat dans tous les puits

Incuber à température ambiante et à l'obscurité pendant 30mn

Arrêter la réaction avec 100µl de la solution de stop

Faire la lecture avec le programme 09 HBs ULTRA.

## ANNEXE 6:

Mode opératoire simplifié de Monolisa® HBC IGM PLUS :

NB : suivre impérativement le mode opératoire de la notice jointe au kit.

Utiliser les sérums de contrôle négatif et positif à chaque mise en œuvre du test pour valider la qualité du test.

Commencer par établir le plan de distribution et d'identification des échantillons (schéma de plaque en annexes) ;

Préparer la solution de lavage (diluer au 1 :20). Préparer 800ml pour une plaque entière de 12 barrettes.

Faire une dilution des échantillons au 1/101. Exemple : 10µl sérum+ 1000µl réactif R5. Ou 5µl sérum+ 500µl réactif R5. Ne pas diluer les réactifs R3 et R4.

Sortir le cadre support et le nombre de barrettes (R1) suffisant de l'emballage protecteur.

Avec la pipette multicanaux, déposer 370µl de solution de lavage dans chaque puits. Aspirer et recommencer une deuxième fois. Utiliser le laveur de plaque pour cela. Essorer en tapotant la plaque renversée sur une feuille de papier absorbant.

Déposer dans les 15min qui suivent

100µl de R3 dans A1, B1, C1

100µl de R4 dans D1, E1, F1

100µl d'échantillon dans G1, H1, A2, etc...

Couvrir les puits d'un film adhésif

Incuber la plaque pendant 30mn  $\pm$ 5mn à 37°C  $\pm$ 1°C

A la fin de l'incubation, retirer le film adhésif et laver la plaque à l'aide du laveur automatique au moins 3 fois.

Essorer en tapotant la plaque renversée sur une feuille de papier absorbant

Avant la fin du lavage, préparer le conjugué (R6+R7)

6ml de R7+ 1 flacon de R6	De 1 à 6 barrettes
12ml de R7+ 2 flacon de R6	Plus de 6 barrettes

Distribuer rapidement 100µl du conjugué (R6+R7) dans tous les puits.

Couvrir les puits d'un film adhésif

Incuber la plaque pendant 60mn  $\pm$ 5mn à 37°C  $\pm$ 1°C

A la fin de l'incubation, retirer le film adhésif et laver la plaque à l'aide du laveur automatique au moins 6 fois.

Essorer en tapotant la plaque renversée sur une feuille de papier absorbant

Avant la fin du lavage, préparer le substrat (R8+R9)

Diluer au 1 :11. Exemple 1ml R9+ 10ml R8

Distribuer rapidement dans chaque puits 80µl de substrat (R8+R9). Vérifier la bonne distribution de la solution de révélation en observant la coloration rose.

Placer la plaque dans une boîte à l'abri de la lumière et laisser incuber pendant 30mn  $\pm$ 5mn à 18-30°C.

Distribuer dans chaque puits 100µl de la solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation.

Essuyer soigneusement le dessous de plaque avec un papier essuie tout.

Lire la densité optique des puits à l'aide du lecteur de microplaques après (4 min et dans les 30 mn) qui suivent l'arrêt de la réaction.

## ANNEXE 7:

Mode opératoire simplifié de Monolisa® ANTI-HBS PLUS :

NB : suivre impérativement le mode opératoire de la notice jointe au kit.

Utiliser les sérums de contrôle négatifs, positifs et le sérum seuil à chaque mise en œuvre du test pour valider la qualité du test.

. Commencer par établir le plan de distribution et d'identification des échantillons (schéma de plaque en annexes) ;

1. Préparer la solution de lavage (diluer au 1 :20). Préparer 800ml pour une plaque entière de 12 barrettes.

2. Sortir le cadre support et le nombre de barrettes (R1) suffisant de l'emballage protecteur.

3. Avec la pipette multicanaux, déposer 25µl de diluant dans chaque cupule.

4. Déposer dans les 15min qui suivent

75µl de C0 dans A1

75µl de C1 dans B1 et C1

75µl de C2 dans D1

75µl de C3 dans E1

75µl de C4 dans F1

75µl d'échantillon dans G1, H1, A2, etc...

5. Homogénéiser le mélange de chaque puits à l'aide de la pipette sans toucher le fond et vérifier la bonne distribution des échantillons et du diluant par l'observation d'une coloration bleue.

6. Couvrir les puits d'un film autocollant

7. Incuber la plaque pendant 60mn ±5mn à 37°C ±1°C

8. A la fin de l'incubation, retirer le film adhésif et laver la plaque à l'aide du laveur automatique au moins 5 fois.

9. Essorer en tapotant la plaque renversée sur une feuille de papier absorbant

10. Avant la fin du lavage, préparer le conjugué (R7a+R7b)

Nombre de barrettes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
R7a (µl)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200
R7b (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

11. Distribuer rapidement 100µl du conjugué (R7a+R7b) dans tous les puits.

12. Couvrir les puits d'un film autocollant

13. Incuber la plaque pendant 60mn  $\pm$ 5mn à 37°C  $\pm$ 1°C

14. A la fin de l'incubation, retirer le film adhésif et laver la plaque à l'aide du laveur automatique au moins 5 fois.

15. Essorer en tapotant la plaque renversée sur une feuille de papier absorbant

16. Avant la fin du lavage, préparer le substrat (R8+R9)

Nombre de barrettes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
R9 (µl)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200
R8 (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

17. Distribuer rapidement dans chaque puits 100µl de substrat (R8+R9). Vérifier la bonne distribution de la solution de révélation en observant la coloration rose.

18. Placer la plaque dans une boîte à l'abri de la lumière et laisser incuber pendant 30mn ±5mn à 18-30°C.

19. Distribuer dans chaque puits 100µl de la solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation.

Essuyer soigneusement le dessous de plaque avec un papier essuie tout.

Lire la densité optique des puits à l'aide du lecteur de microplaques après (4 min et dans les 30 mn) qui suivent l'arrêt de la réaction.

## ANNEXE 8:

Mode opératoire simplifié de Monolisa® AGHBe PLUS :

1. Préparer la solution de lavage.
2. Sortir de l'emballage protecteur, le cadre support, et le nombre de barrettes nécessaires.
3. Distribuer dans les cupules, successivement (plan de plaque suggéré) :
  - A1, B1, C1 : 100 µl de contrôle négatif (R3)
  - D1 : 100 µl de contrôle positif (R5)
  - E1, F1, G1 : 100 µl d'échantillon inconnu

En fonction du système utilisé, il est possible de modifier la position ou l'ordre de distribution des contrôles.

4. Recouvrir d'un film adhésif, laisser incuber 3 heures  $\pm$  10 minutes à 37°C  $\pm$  1°C.
5. Préparer la solution de conjugué R7b avant la fin de la première incubation.
6. Retirer le film adhésif, vider par aspiration le contenu de chaque cupule dans le conteneur de déchets, puis laver quatre fois.
7. Distribuer rapidement 100 µl de la solution de conjugué R7b pré dilué ou, le conjugué pouvant aussi être utilisé sans pré dilution préalable, déposer dans l'ordre 80µl de R2 dilué puis 20µl de conjugué R7b par cupule. Homogénéiser.

Couvrir d'un film adhésif et laisser incuber 30 minutes (minimum 25 minutes, maximum 40 minutes) à 37°C  $\pm$  1°C.

NB : Visuellement, une coloration bleue turquoise peut être observée après addition du conjugué R7b. Il est possible de vérifier par lecture photométrique à 620nm la présence du conjugué R7b dans les cupules.

- 8 .Retirer le film, vider le contenu de chaque cupule, dans le conteneur de déchets puis laver cinq fois.
9. Préparer la solution de révélation enzymatique (R8 + R9).

10. Distribuer rapidement 80 µl de la solution de révélation par cupule et placer la plaque 30 minutes ± 5 minutes à l'obscurité à température ambiante (+18 - 30°C).

N.B.: La distribution de la solution de révélation, qui est colorée en rose, peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation : Il y a une différence de coloration significative entre une cupule vide et une cupule contenant la solution de révélation rosée.

11. Ajouter rapidement 100 µl de la solution d'arrêt (R10) dans chaque cupule.

N.B.: La distribution de la solution d'arrêt, qui est incolore, peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation. La coloration du substrat, rosée (pour les échantillons négatifs) ou bleue (pour les échantillons positifs), disparaît des cupules qui deviennent incolores (pour les échantillons négatifs) ou jaunes (pour les échantillons positifs) après addition de la solution d'arrêt.

12. Attendre 4mn avant la lecture.

13. Essuyer soigneusement le dessous de la plaque, et lire la densité optique à 450/620 nm, dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

## **ANNEXE: 9**

### **Fiche signalétique**

**Nom** : BENGALY

**Prénom** : Karim

**E-mail** : karimbengaly@yahoo.fr

**Titre de la thèse** : Intérêt de l'évaluation de la charge virale de l'hépatite B chez les donneurs de sang à Bamako.

**Année** : 2016 -2017

**Pays d'origine** : Mali

**Ville de soutenance** : Bamako

**Lieu de dépôt** : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie.

**Secteur d'intérêt** : Santé publique et de Maladies infectieuses.

**Résumé** : La recherche de l'ADN viral chez les donneurs de sang permettrait d'écarter les produits sanguins contaminants en vue de réduire la transmission de l'hépatite B chez les receveurs

L'objectif général de cette étude était d'évaluer la charge virale de l'hépatite B par la méthode moléculaire chez les donneurs de sang à Bamako au Mali.

Une étude transversale s'est déroulée, de janvier 2015 au septembre 2016 au CNTS de Bamako. Le test utilisé est la méthode moléculaire par PCR en Temps Réel.

295 donneurs inclus dans l'étude, majoritairement constitués de donneurs de compensation (72%), le groupe d'âge 31- 49 était la plus représentée (42%). La majorité des donneurs de sang de notre étude portant de l'Antigène HBs avait une charge virale élevée (58%) des cas dont 31% de ceux ayant l'antigène HBs positif avaient une charge virale non détectable.

**Mots clés** : VHB, charge virale, donneurs de sang.

## **SERMENT D'HIPPOCRATE**

En présence des Maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail ; je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**JE LE JURE !**