

UNIVERSITE SENGHOR

Université internationale de langue française

Au service du développement africain

Opérateur direct de la Francophonie

MASTER EN DEVELOPPEMENT

DEPARTEMENT : SANTE

SPECIALITE : SANTE INTERNATIONALE

**PREVALENCE, FACTEURS DE RISQUES ET
EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE L'HEPATITE
VIRALE DELTA AU SUD TOGO**

PRESENTE ET SOUTENU PAR :

Folly ANYOVI

XV^{ème} Promotion : 2015-2017

Alexandrie

EGYPTE



Université Senghor

Université internationale de langue française
au service du développement africain

Opérateur direct de la Francophonie

PREVALENCE, FACTEURS DE RISQUES ET EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE L'HEPATITE VIRALE DELTA AU SUD TOGO

Présenté par :

Folly ANYOVI

Pour l'obtention du Master en développement de l'Université Senghor

Département de Santé

Spécialité en Santé Internationale

Soutenu le 25/01/2017 devant le jury composé de :

Président : **Dr Françoise-Marie LAHAYE**, Directeur de Département Santé, Université Senghor

Membres : **Prof Christophe RAPP**, Professeur Directeur médical CMETE, Ecole Val de Grâce

Dr Serge DIAGBOUGA, Maître de Recherche, IRSS (Directeur de Mémoire)

Université Senghor Opérateur directe de la Francophonie

1, Place Ahmed Orabi, BP: 451, 21111 El Manheya, Alexandrie-Egypte

www.usenghor-francophonie.org

DEDICACE

A

Mon père ANYOVI Théodore, que la terre te soit légère ;

ANYOVI Freud Emmanuel

*« Parmi tous les mystères qui nous entourent, rien n'est plus certain que l'existence d'une
Energie Infinie et Eternelle qui est la Source de toutes Choses » **Herbert Spencer***

REMERCIEMENTS

Président du Jury

Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de présider ce jury. Cette disponibilité pour la cause scientifique que nous trouvons auprès de vous exalte notre admiration.

Recevez l'expression de notre profonde gratitude.

Maitre et Juge

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de faire partie de ce jury malgré votre emploi du temps chargé. Nous avons souhaité votre présence dans ce jury pour bénéficier de vos suggestions combien pertinentes et constructives.

Directeur de Mémoire

C'est l'occasion encore pour moi de vous remercier pour l'attention particulière que vous avez portée à ce travail. En acceptant de diriger ce travail vous n'avez ménagé ni votre temps, ni vos ressources pour sa bonne marche et vos conseils m'ont été très utiles. Votre amour du travail bien fait est louable. Veuillez accepter ma reconnaissance.

A Mme Alice MOUNIR, la Grande sœur qui était toujours présente pour nous et qui nous comprend toujours.

Au Professeur Jacques SIMPORE, pour vos conseils et votre rigueur scientifique que vous nous inculqué, nous as valu ce diplôme, merci Professeur.

Au Prof. Jean Michel PAWLOTSKI, Prof. Stéphane CHEVALIEZ, Dr EMMANUEL GORDIEN, Dr FRÉDÉRIC LE GAL, Dr SEGOLENE BRICHLER, ATHENAÏS GERBER, merci pour tous ce que vous m'avez appris et de m'avoir accepté dans votre équipe.

Au Prof. Beate KAMPMANN d'Imperial College (Londre) pour vos conseils dans le choix de ce master. Merci Beate.

A tous les techniciens du laboratoire de virologie d'Henri Mondor et Avicenne. Merci du fond de cœur.

A tous les collègues de la XV^{ème} promotion.

RESUME

Introduction : A l'heure actuelle l'hépatite virale constitue un problème majeur de santé publique dans le monde, en particulier en Afrique où le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'hépatite delta (VHD) sont fortement endémiques. Elle est causée par différents types de virus et conduit aux morbidités liées au foie. L'association des facteurs viraux, tels que la charge virale et les génotypes se sont révélés être liés à la pathogenèse du carcinome hépatocellulaire et à la réponse aux traitements. Peu d'études se sont intéressées à l'épidémiologie moléculaire du VHB, VHC et VHD au Togo. L'objectif de cette étude vise à contribuer à nouveau à la connaissance de la co-infection VHB/VHD et les génotypes prédominants au Sud Togo ainsi que leur distribution et les facteurs avec lesquels ils sont associés.

Méthodes : Cette étude menée à *L'ONG ASADH (Association Sauvons l'Afrique Des Hépatites)* en collaboration avec le laboratoire *Biogenes Institute (BGI)* à Lomé-Togo et le Laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène unité de virologie Avicenne Virus de l'Hépatite Delta, Laboratoire associé au CNR de l'Hépatites B, C et Delta en France a concerné 119 sujets. Tous les sujets (119) avaient un TRD (Test Rapide d'Orientation du Diagnostic) positif pour la détection de l'AgHBs et 17 sujets avaient une sérologie delta positif pour la détection des anticorps anti-VHD. Les techniques de la sérologie automatisée, la RT-PCR, la PCR ont été utilisés respectivement pour la quantification des acides nucléiques (ARN) chez les sujets positifs à la sérologie automatisée. Le séquençage et la phylogénie ont été utilisés pour la détermination des génotypes.

Résultats : Parmi les 119 patients AgHBs-positif, 17 (14,28%) patients avaient des anticorps dirigés contre le VHD. Environ un tiers des individus séropositifs pour le VHD avait un ARN du VHD détectable. La charge virale moyenne était de $5,97 \pm 1,22$ Copies/mL. Le génotype viral a été déterminé chez 9 des 17 patients ayant un ARN détectable. Tous les sujets étaient infectés par un génotype 1.

Conclusion : Dans cette étude nous confirmons la présence des génotypes 1 du VHD au Togo mais aussi mettons en évidence pour la deuxième fois au Togo à notre connaissance la prédominance du génotype 1 du VHD.

Mots clés : VHB, VHD, RT-PCR, Génotypage, Phylogénie, Sud Togo.

ABSTRACT

Introduction: Viral hepatitis is a major public health problem worldwide, particularly in Africa where the virus of hepatitis B (HBV) and hepatitis delta (HDV) are highly endemic. It is caused by different types of virus and leads to liver-related morbidities. The association of viral factors, such as viral load and genotypes were found to be associated with the pathogenesis of hepatocellular carcinoma and response to treatment. Few studies have focused on the molecular epidemiology of HBV, HCV and HDV in Togo. The objective of this study is to contribute again to the knowledge of HBV/HDV co-infection and genotypes prevalent in Southern Togo and their distribution and the factors with which they are associated.

Methods: This study conducted at The Asadh NGOs (Association Of Hepatitis Saving Africa) in collaboration with the *Biogenes Institute* (BGI) in Lome-Togo and the Laboratory of Virology Unit Bacteriology-Virology-Hygiene Avicenna Virus Hepatitis Delta, Laboratory associated with the CNR of Hepatitis B, C and Delta in France has involved 119 subjects. All Topics (119) had TRD (Rapid Test Guidance Diagnostics) positive for the detection of HBsAg and 17 subjects had a positive delta serology for the detection of anti-HDV. Automated serology techniques, RT-PCR, the PCR were respectively used for the quantification of nucleic acids (RNA) in positive subject's automated serology. The sequencing and phylogeny were used for genotyping.

Results: Among 119 HBsAg-positive patients, 17 (14.28%) patients had antibodies against HDV. About a third of HDV-positive individuals for the HDV had a detectable HDV RNA. The average viral load was 5.97 ± 1.22 copies/mL. The viral genotype was determined in 9 of 17 patients with detectable RNA. All subjects were infected with genotype 1.

Conclusion: In this study, we confirm the presence of genotypes 1 HDV in Togo but also highlight the second time in Togo our knowledge the dominance HDV. ge1

Key words: HBV, HDV, RT-PCR, Genotyping, Phylogenie, South Togo.

TABLE DES MATIÈRES

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS.....	ii
RESUME	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES ABREVIATIONS.....	vii
INTRODUCTION	1
1. VIRUS DE L’HEPATITE D.....	3
1.1. Le Virus	3
1.2. Structure du virus et organisation génétique.....	3
1.3. Antigène delta	4
1.4. Cycle viral du VHD.....	5
1.5. Epidémiologie	6
1.5.1. Prévalence et distribution géographique.....	6
1.5.2. Epidémiologie moléculaire et génotypique	7
1.6. Variabilité génétique	8
1.7. Mode de transmission.....	8
1.7.1. Caractéristiques cliniques.....	9
1.7.1.1. Formes d’acquisition	9
1.7.1.2. L’évolution clinique et les modèles sérologiques.....	10
1.8. Diagnostic.....	10
1.8.1. Détection du virus.....	10
1.8.2. Evaluation de la maladie.....	12
1.8.3. Co-infection VHB-VHD.....	12
1.8.4. Surinfection VHB-VHD	13
1.8.5. Diagnostic de l’hépatite chronique D	14
1.9. Histoire naturelle.....	14
1.10. Prévention.....	15
1.11. Traitement	16
2. OBJECTIF DU MEMOIRE:.....	16
3. MATERIELS ET METHODES	18
3.1. Cadre d’étude.....	18
3.2. Type et période d’étude	18

3.3. Matériels et réactifs de Laboratoire	18
3.4. Méthode d'étude	18
3.4.1. Population d'étude.....	18
3.4.2. Critères d'inclusion.....	18
3.4.3. Critères d'exclusion.....	19
3.4.4. Paramètres étudiés et recueil des données.....	19
3.5. Méthodes Virologiques	19
3.5.1. Marqueurs Sérologiques du VHB, VHD et du VHC.....	19
3.5.2. Principe des tests rapide d'orientation diagnostique (TROD) HEALTH MATE Rapid®	19
3.5.3. Principe des tests sérologiques qualitatifs sur ELISA Statax	18
3.5.4. Principe de méthode ELISA pour la détection des anticorps anti-VHD	18
4. Marqueurs moléculaires du VHD.....	19
5. Technique de quantification des acides nucléiques.....	19
5.1. Principe de la détection-quantification de l'ARN du VHD à l'aide de la plate-forme de PCR en temps réel <i>m2000</i> (Abbott)	19
6. Détermination des génotypes viraux	19
6.1. Principes.....	19
6.1.1. Principe de l'extraction des acides nucléiques	19
6.1.2. Principe de la RT-PCR one step.....	20
6.1.3. Principe de la PCR nichée	20
7. Visualisation des produits d'amplification.....	20
8. Purification des acides nucléiques.....	20
9. Principe du séquençage selon la méthode de SANGER.....	20
10. Analyse des séquences nucléotidiques.....	21
11. Détermination des génotypes du VHD	22
12. RESULTATS.....	27
12.1. Caractéristiques démographiques de la population.....	27
12.2. Facteurs de risque de transmission.....	28
12.2. Hépatite B.....	29
12.3. Hépatite D	29
13. DISCUSSION.....	30
14. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	33
15. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Enveloppées, sphériques d'environ 22 nm de diamètre.....	4
Figure 2: Les domaines fonctionnels de S-AgHD et L-AgHD.....	5
Figure 3: Cycle du vie du VHD	6
Figure 4: Représentation schématique des principales zones de distribution du VHD dans le monde.....	7
Figure 5: Prevalence of hepatitis delta virus infection among HBV carriers.	8
Figure 6: Résultat de la co-infection et surinfection du VHD par rapport au risque de développer l'hépatite filminante, la chronicité et la cirrhose.	13
Figure 7: Sérologique et les changements biochimiques sériques associés à la co-infection du VHD aiguë	14
Figure 8: Exemple du test HEALTH MATE Rapid ® HBV.....	20
Figure 9: Photographie d'un électrophorégramme de séquençage	21
Figure 10: Analyse phylogénique des séquences nucléotidiques de la région R0 du VHD isolés dans la population du Sud Togo par comparaison à des séquences de référence disponibles dans les banques.	31

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude.....	27
Tableau II: Facteurs de risque de transmission du VHD.....	28
Tableau III: Caractéristiques virologiques des patients AgHBs-positif.....	29
Tableau IV: Caractéristiques virologiques des patients séropositifs pour le VHD.....	30

LISTE DES ABREVIATIONS

- aa : Acide aminé
- Ac: Anticorps
- Anti-HBs : Anticorps dirigé contre la protéine de la surface
- Anti-HBc : Anticorps dirigé contre la protéine du core
- AgHBs: Antigène de Surface
- ADN: Acide désoxyribonucléique
- ADNc: complémentaire
- ADNccc: *covalently closed circular*
- ADN-RC : relâché circulaire
- Ag: Antigène
- ARN: Acide ribonucléique
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- ALT : Alanine amino-transférase
- ASADH : Association Sauvons l’Afrique Des Hépatites
- CHC : Carcinome Hépatocellulaire
- CNR : Centre national de référence
- DHBV : Duck Hepatitis B Virus (virus de l’hépatite B du canard)
- ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay
- IgG: Immunoglobuline G
- IgM: Immunoglobuline M
- Kda: Kilodalton
- MEIA : Microparticle Enzymo-Immuno-Assay
- ONG : Organisation Non Gouvernementale
- PCR : Polymerase chain reaction
- VHB : Virus de l’Hépatite B
- VHC : Virus de l’Hépatite C
- VHD : Virus de l’hépatite D
- γ -GT : Gamma glutamyl-transférase
- RIA : Radio Immunology Assay
- RT-PCR : Reverse transcription polymérase chaîne réaction
- YMDD: Tyrosine-Methionine-Aspartate-Aspartate

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'hépatite vient du mot latin qui signifie l'inflammation du foie (1). A l'heure actuelle l'hépatite virale constitue un problème majeur de santé publique dans le monde, en particulier en Afrique où le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'hépatite delta (VHD) sont fortement endémiques (1, 2). Elle est causée par différents types de virus et conduit aux morbidités liées au foie (3, 4). La plupart du temps l'infection hépatique est causée par un virus, mais parfois l'infection peut se produire par plusieurs virus et conduit à différents problèmes, dont une incidence plus élevée de la morbidité et de la mortalité (1). Comme le virus de l'hépatite C (VHC), le VHB et le VHD sont transmis par des voies semblables (par le sang ou les produits sanguins), provoquant d'une double, voire une triple infection en même temps chez certains patients (5, 6). Le VHD est un virus déficient hépatotropique dont l'infectiosité dépend du VHB pour la fourniture de son enveloppe, qui se compose de l'antigène de surface (AgHBs) du VHB (7-9). La super- ou co-infection du VHD est un risque majeur pour la santé des patients infectés par le VHB de façon chronique ou aiguë en raison de l'augmentation du risque d'hépatite fulminante ou de progression sévère de la maladie (7). Des enquêtes sérologiques ont montré que l'infection par le VHD est présente dans le monde entier, mais avec une répartition irrégulière. Sa prévalence est estimée à 5% chez les individus infectés par le VHB. Suite à la mise en œuvre des programmes de vaccination contre le VHB dans les années 1990, une baisse significative de l'incidence a été signalée (10). Cependant, l'incidence est en augmentation en Europe orientale et australe (8) en Afrique sub-saharienne, dans le bassin de l'Amazonie, des parties de l'Asie et le Moyen-Orient (11, 12). Actuellement huit génotypes différents du VHD ont été signalés et les génotypes 1, 5 à 8 ont été caractérisés en Afrique sub-saharienne. Pour la première fois (13) ont montré l'existence des génotypes 1 et 5 au Togo, très peu d'études d'épidémiologie moléculaire ont été consacrées aux hépatites virales. Des études de la prévalence d'épidémiologiques moléculaires du VHD et de la détermination des génotypes du VHB et du VHD en circulation dans les régions endémiques au VHB du Togo sont nécessaires pour évaluer et améliorer les mesures de contrôle de la co-infection VHB/VHD. Dans cette étude, nous avons donc étudié la séroprévalence du VHD et la circulation des génotypes VHB et VHD dans les échantillons de sérum à AgHBs positif du Sud Togo ainsi que leur distribution et les facteurs auxquels ils sont associés.

REVUE BIBLIOGRAPHIE

1. VIRUS DE L'HEPATITE D

1.1. Le Virus

Le virus de l'hépatite D (VHD), responsable de l'hépatite delta, a été identifié en 1977 par Mario Rizzetto et ses collègues, dans une cohorte de virus de l'hépatite B (VHB) des patients infectés qui ont eu une hépatite sévère (14). Le virus de l'hépatite delta (VHD) est un agent infectieux satellite du VHB, qui se transmet exclusivement dans le contexte d'une infection par le VHB(15-17) : le VHD ne peut être ainsi transmis que chez les individus qui ont simultanément ou antérieurement acquis le VHB. La transmission peut survenir au cours d'une infection simultanée avec le VHB ou d'une surinfection par le VHD chez un sujet porteur chronique de l'AgHBs (8, 16). En raison de ses caractéristiques qui le distinguent parmi tous les virus du règne animal, le comité international de taxonomie virale a proposé de classer le VHD dans le genre des *Deltavirus* (18).

1.2. Structure du virus et organisation génétique

Le virion du VHD est une petite particule sphérique d'environ 36 nm de diamètre(19). C'est un virus à ARN simple brin de polarité négative, d'une taille de 1700 nucléotides (20, 21), qui code une seule protéine structurale, l'antigène de l'hépatite delta (AgHD). Une autre spécificité du VHD est le fait que c'est le seul virus à posséder un génome à ARN circulaire (22). Cependant, l'aspect le plus fascinant de la biologie de ce virus concerne sa réplication. Le VHD se réplique selon le mécanisme du cercle roulant. Tandis que la plupart des virus à ARN (excepté les rétrovirus) répliquent leur génome en utilisant une ARN polymérase ARN dépendante virale, obtenue à partir de leur propre génome, le VHD utilise une polymérase contenue dans les cellules de l'hôte, vraisemblablement l'ARN polymérase de type II. De plus, le VHD contient des séquences d'ARN capables d'exercer une activité catalytique (ribozyme) nécessaire pour produire des copies unitaires de fragments d'ARN viral avant leur assemblage (23).

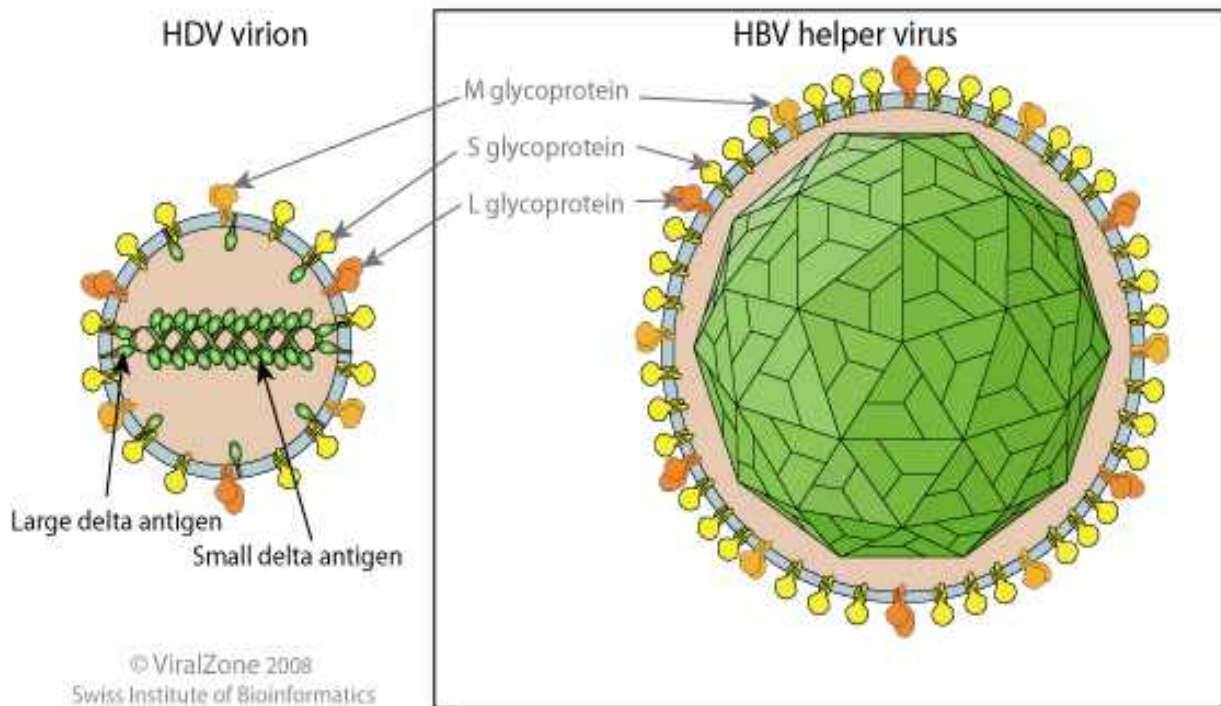


Figure 1: Enveloppées, sphériques d'environ 22 nm de diamètre. Les protéines membranaires sont issues du virus VHB helper. (24)

1.3. Antigène delta

L'AgHD est codé par le génome du VHD. Il existe deux types d'AgHD : le petit AgHD et le grand AgHD (Figure 2). La séquence N-terminale de ces deux types est la même mais, la dernière se diffère de la première par la présence de 19 amino acides supplémentaires en position C-terminale, résultant d'un mécanisme d'édition de l'ARN viral(25).

Cette modification post-traductionnelle est réalisée par une adénosine désaminase dépendant de l'ARN cellulaire double brin, et permet au VHD de synthétiser, en plus de la protéine SHD, une grande protéine (LHD) essentielle à l'assemblage et à la production des particules virales (26).

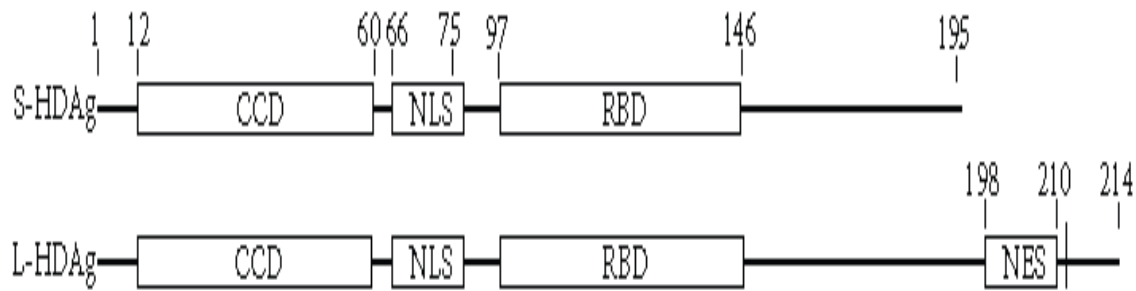


Figure 2: Les domaines fonctionnels de S-AgHD et L-AgHD (27).

1.4. Cycle viral du VHD

Le récepteur du VHD sur les hépatocyte humain reste non identifié, mais on pense qu'il est le même que celui du VHB en raison de l'identité partagée de leur enveloppe extérieure(19). Alors, l'infection par le VHD débute par la fixation de la particule virale par l'intermédiaire de la région PreS1 localisée au niveau de la protéine L avec le récepteur exprimé à la surface des hépatocytes, le transporteur d'acides biliaires NTCP (16, 26). Les étapes suivantes de décapsidation et de transport vers le noyau ne sont pas totalement comprises (28). La réplication du génome a lieu dans le noyau selon le modèle du cercle roulant mettant en jeu des ARN polymérase ADN dépendante cellulaires (ARN polymérase II). Ce modèle repose sur la formation de transcrits multimériques (dimères et trimères) linéaires. Pour la réplication du VHD, trois activités enzymatiques sont nécessaires : une polymérase qui synthétise les brins oligomériques à partir des formes circulaires, une activité ribozyme ARN dépendante permettant leurs clivages en brins unitaires et une ligase afin de circulariser les monomères. La ribonucléoprotéine VHD est enveloppée dans l'appareil de Golgi par l'AgHBs. La sécrétion est supposée avoir lieu au niveau du Golgi (16, 29, 30).

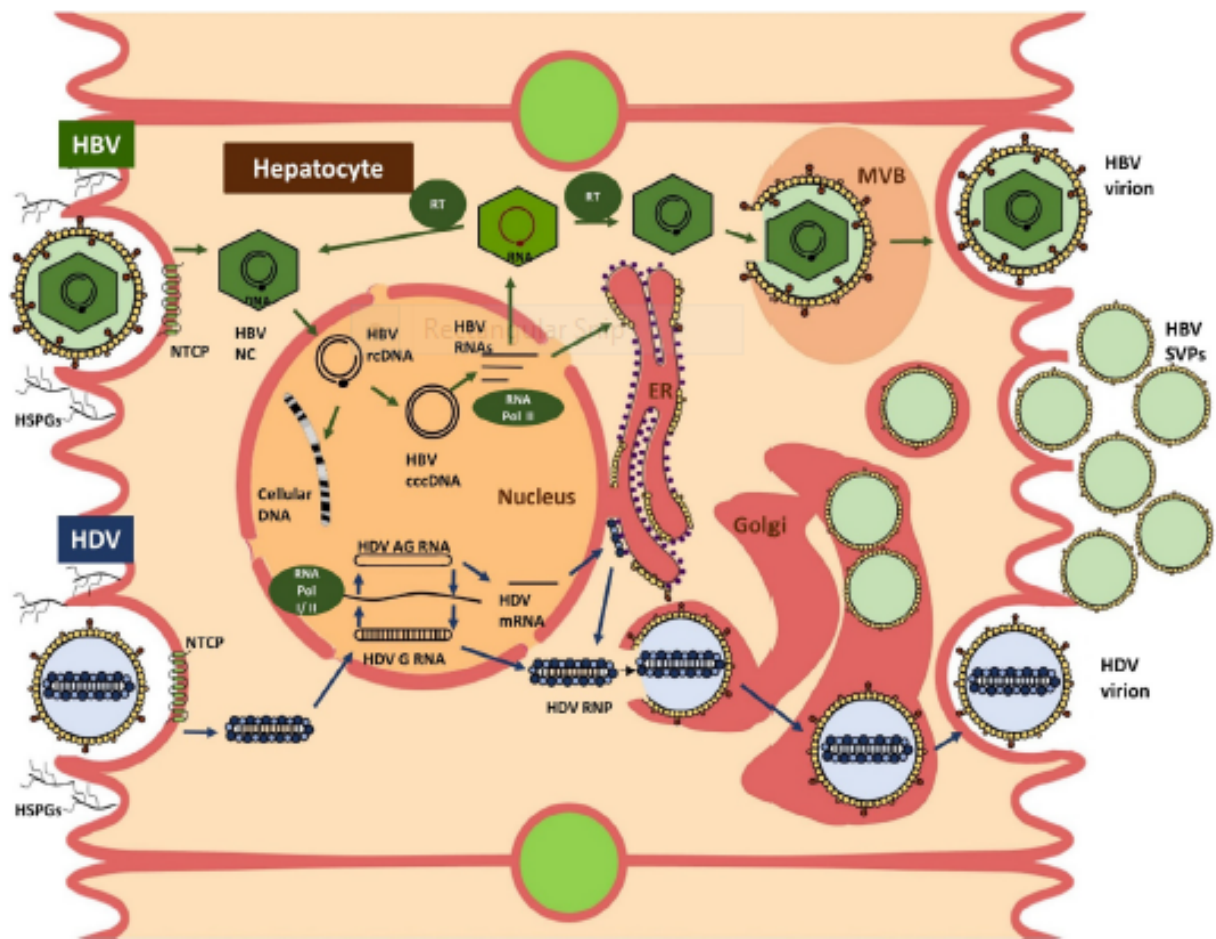


Figure 3: Cycle du vie du VHD (16)

1.5. Épidémiologie

1.5.1. Prévalence et distribution géographique

Parmi les 350 à 240 millions d'individus qui sont des porteurs chroniques de l'AgHBs dans le monde, environ 5%, soit 10 à 15 millions seraient co-infectés par le VHD (Figure 4) (31, 32). Bien que l'infection au VHD ait été rapportée dans le monde entier, sa fréquence n'est pas uniforme. Le taux d'infection par le VHD est généralement plus élevé dans les régions où le VHB est endémique. Les plus fortes prévalences ont été rapportées en Afrique Centrale, dans le Bassin amazonien, en Europe de l'Est et Europe méditerranéenne, dans le Moyen-Orient et dans certaines régions d'Asie(33).

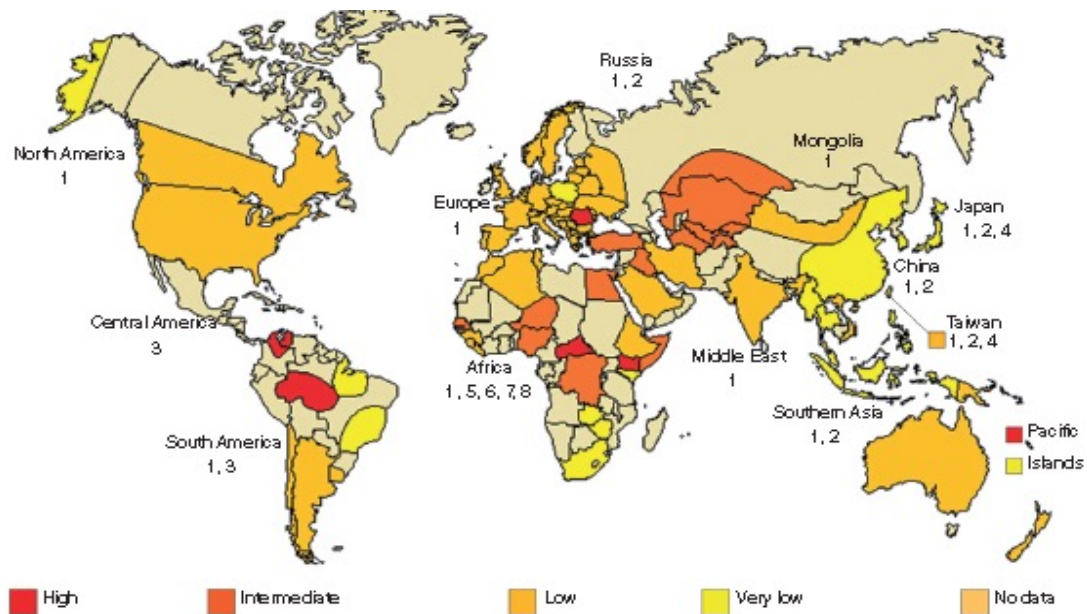


Figure 4: Représentation schématique des principales zones de distribution du VHD dans le monde (33).

1.5.2. Épidémiologie moléculaire et génotypique

L'évolution du VHD semble résulter de trois mécanismes principaux: la mutation, l'édition et, comme décrit récemment la recombinaison (34). Le taux de substitution pour le VHD, déterminée in vivo par l'évaluation longitudinale des échantillons de patients a été estimée à $5,9 \cdot 10^4$ à $3,0 \cdot 10^2$ de substitutions par site et par an, variant avec la phase de l'infection (plus élevée dans la phase aiguë), l'emplacement du génome (plus élevé dans les régions moins conservées que dans les régions conservées telles que ribozyme) (35), et l'augmentation de la pression thérapeutique (36, 37). Ces valeurs semblent être plus élevées que pour la majorité des virus à ARN qu'ont estimé les taux entre $1 \cdot 10^5$ et $3,4 \cdot 10^3$; à titre d'exemple, le VHC est estimé à un taux de $7,9 \cdot 2,5 \cdot 10^4$ et le VIH 10^3 (38) la substitution. A long terme, l'étude in vitro a identifié un taux de $2 \cdot 10^2$ de substitution et a suggéré que 70% de cette substitution peut être liée à des événements d'édition (39). Ces preuves de la diversité génétique a conduit à la proposition selon laquelle, chez le même patient, le VHD, comme décrit également pour d'autres virus à ARN, circule comme une quasi-espèce (36). La recombinaison a d'abord été proposée à partir d'une analyse de l'échantillon des patients en 1999, puis confirmée dans les infections à génotypes mixtes, à la fois in vivo et in vitro, et récemment retrouvée chez un patient souffrant d'hépatite aiguë au Vietnam (16, 40, 41). La matrice de commutation entraîné par l'ARN polymérase de l'hôte a été proposé comme le mécanisme de

recombinaison le plus probable de l'ARN du VHC (39, 42). A partir de l'analyse phylogénétique des séquences du VHD dans le monde, huit génotypes distincts ont été proposés, associés à la distribution géographique et aux caractéristiques cliniques (22, 43). Les différences de séquence au sein d'un génotype sont inférieures à 20%, mais peuvent s'élever à 35% entre les différents génotypes (37).

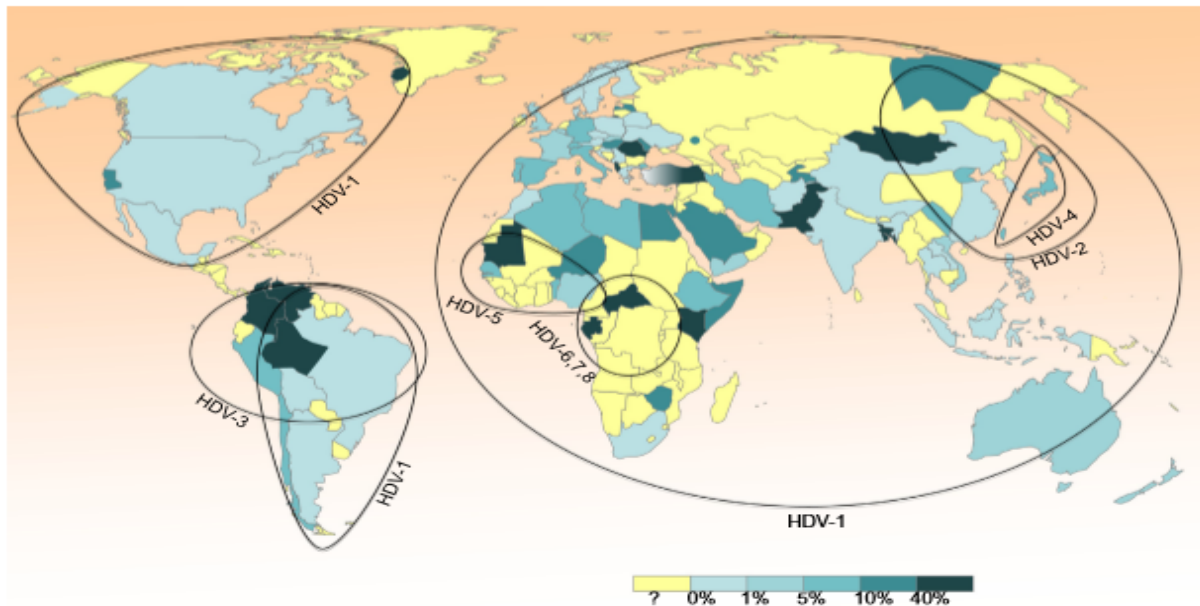


Figure 5: Prevalence of hepatitis delta virus infection among HBV carriers (16).

1.6. Variabilité génétique

A ce jour, huit génotypes du VHD ont été signalé et diversement répartis, ont été identifiés. Le génotype 1 est distribué dans le monde entier, tandis que des infections dues au 2 et 4 sont présents au Japon et Taïwan. Le génotype 3 en Amazonie et les génotypes 5, 6, 7 et 8 en Afrique. Quelques études ont montré que les génotypes 3 et 4 pouvaient être associés à des formes cliniques particulièrement sévères (29, 44, 45).

1.7. Mode de transmission

La transmission par voie parentérale est considérée comme la principale voie de transmission du VHD. La principale voie de transmission peut cependant varier entre zones de basse et de haute prévalence. En Europe et aux USA la transmission se produit principalement par contact avec du sang infecté, en particulier chez les personnes injectant les drogues

intraveineux (UDI), souvent en association avec le VIH et le VHC. Il est également montrée, que la transmission homosexuelle et hétérosexuelle du VHD peut se produire et peut être particulièrement utile dans les zones fortement endémiques (11, 46). La transmission intrafamiliale impliquant vraisemblablement l'échange inapparente de fluides corporels, se produit dans les communautés à faible revenu et comme la montre l'analyse de séquence dans une population italienne dans les années 90 (47). La transmission verticale du VHD n'a pas été décrite dans la transmission mère-enfant à la naissance. Elle est peut-être défavorisée par l'action de la réplication du VHD en abaissant le VHB (16).

1.7.1. Caractéristiques cliniques

1.7.1.1. Formes d'acquisition

Le VHD est un virus satellite qui peut établir une infection productive et la propagation uniquement dans les cellules infectées. Cela se fait de façon concomitante par son virus parasite, le VHB. Cliniquement, ceci se traduit par deux formes possibles d'acquisition du VHD : (i) simultanément avec hépatite B, ce qui correspond à une co-infection ou (ii) par une infection d'un patient déjà infectés de manière chronique par le VHB, ce qui correspond à une surinfection. La co-infection se traduit par une hépatite aiguë, allant de légère à sévère, voire fulminante, et conduit généralement de 90 à 95% des cas à la résolution des deux infections par le VHB et VHD. Cela signifie que le taux de progression vers la chronicité est aussi faible que pour le VHB chez l'adulte immunocompétent. La proportion de l'hépatite fulminante dans ce cadre peut atteindre 17%, ce qui est beaucoup plus élevé que celui observé dans l'infection aiguë par le VHB (48). La super-infection, peut également se traduire par un épisode d'hépatite aiguë et conduire à une hépatite fulminante (49). Malgré le peu d'expérience sur des patients et de la séroconversion du HBe sur la super-infection du VHD, la grande majorité d'entre eux progresse vers une infection chronique par les deux virus (50). Dans la transplanté du foie aux patients atteints du VHB /VHC, le «helper infection VHD indépendant» ou «latente», l'infection par le VHD a été suggérée avec des marqueurs de réplication du VHD identifiés dans le foie et le sérum en l'absence de marqueurs du VHB (51). La ré-évaluation de certains de ces cas, en utilisant des techniques de PCR plus sensibles, a montré que l'infection au VHD a été maintenue en parallèle avec une réplication du VHB de très bas niveau, ce qui exclut la possibilité d'une infection par le VHC isolé (16, 52).

1.7.1.2. L'évolution clinique et les modèles sérologiques

La co-infection VHB/VHD aiguë est dans la plupart des cas cliniquement indiscernables de l'infection aiguë par le VHB. Cependant, certains patients (15% dans certaines cohortes) peuvent présenter une évolution clinique sévère avec un modèle d'hépatite biphasique, associée à une nouvelle augmentation du taux de transaminases après une première période d'amélioration. L'on suppose que cette augmentation est dû successivement au VHB et au VHD (53). La super-infection aiguë par le VHD d'un patient du VHB chronique se caractérise cliniquement par un éclat d'auto-limite d'une inflammation du foie qui peut être considéré à tort comme la réactivation de l'hépatite B. Et est généralement suivi par la progression vers la chronicité des deux infections. Au cours de l'hépatite delta aiguë, les marqueurs du VHD ne permettent pas une distinction fiable entre co- et super-infection. Le diagnostic est établi en fonction de la présence d'anticorps anti-HBc IgM (dirigé contre la capsid du VHB) qui est positif dans le cadre d'une infection aiguë par le VHB (comme cela est le cas dans la co-infection) et reste négatif ou à un très faible titre chez les patients super-infectés. L'hépatite fulminante (insuffisance hépatique aiguë chez un patient sans maladie du foie avant) est plus fréquente chez les patients infectés par le VHD que chez les patients mono infectés par le VHB et, sans une transplantation du foie, est associée à une mortalité de 80%. Le VHD chronique est cliniquement indissociable de l'infection chronique par le VHB, mais avec une progression plus rapide vers la cirrhose et carcinome hépatocellulaire (CHC) (16).

1.8. Diagnostic

1.8.1. Détection du virus

Compte tenu de la forte prévalence de l'infection par le VHD dans certaines parties du monde et l'absence de baisse en Europe et en Amérique du Nord, il y a un consensus croissant pour suggérer que tous les patients infectés par le VHB (y compris les porteurs inactifs) soient examinés, au moins au diagnostic du VHB chronique, pour l'infection par le VHD (54, 55). Ceci a été proposé dans les directives de l'Association Européenne de l'Etude sur le foie (EASL), mais pas dans la contrepartie nord-américaine. En effet, les recommandations de l'AASLD restreignent encore le dépistage du VHD à des patients infectés par le VHB provenant des pays endémiques ou ayant des antécédents d'utilisation de drogues intraveineuses (16, 56). L'anticorps anti-VHD " total "(à savoir contre VHD-IgM, plus anti-VHD IgG) testé devrait être utilisé comme une première approche du diagnostic de l'hépatite

delta, compte tenu de son apparition précoce après l'infection au VHD et sa persistance tout au long de la maladie (57). Il y a deux limites à cette approche : en premier lieu, dans les premiers jours après l'infection, les anticorps anti-VHD peuvent être indétectables, et les patients présentant une hépatite aiguë positif AgHBs doivent être réévalués pour l'apparition d'anticorps anti-VHC; d'autre part, anti-HDV IgG peut persister après la résolution de l'infection du VHD. Une sérologie anti-VHD positif devrait être confirmée, idéalement par la détection de sérum (VHD ARN). Dans les milieux où le PCR (VHD) est indisponible, l'anti-VHD IgM peut être considérée comme un marqueur de substitution du VHD infection active et sa clairance est corrélée à la réponse thérapeutique (58). L'AgHBs mesuré dans les sérums est d'une utilité limitée, comme chez les patients immunocompétents il est seulement transitoirement détecté juste avant la phase aiguë de l'infection au VHD, précédant la montée d'anticorps anti-VHD. Dans la phase chronique de la maladie, il ne peut être occasionnellement détecté chez les patients immunodéprimés (16). En ce qui concerne d'autres infections virales, la quantification de l'acide nucléique joue un rôle croissant plus important dans le diagnostic et le suivi thérapeutique chez les patients infectés par le VHD. Cependant, contrairement aux VHB, VHC ou le VIH, il n'y a pas de technique PCR entièrement standardisée. Le diagnostic moléculaire du VHD repose principalement sur des techniques maison développées dans les centres universitaires. Étant donné la grande variabilité génétique de l'ARN viral, la quantification des non-génotypes 1 ou spécifiques africaine de génotype 1 échantillon doit encore être optimisé (59). Le nombre de techniques qRT-PCR publiées a augmenté au cours des dernières années, sur la base des étapes deux à deux et des protocoles en une étape (16, 22, 60, 61). Les défis techniques importants associés à l'amplification du VHD proviennent de la teneur en GC élevée, de la complémentarité de l'ARN viral (qui peut limiter l'efficacité de la RT) et de la variabilité génétique du VHD nécessitant une conception minutieuse des amorces et des sondes (22). L'utilisation d'un contrôle standard et interne robuste PCR sont également essentiels pour une quantification de l'ARN du VHD. Compte tenu de la nécessité d'une évaluation de la qualité internationale et de contrôle, une norme internationale PCR n'a pas été validée par l'Organisation Mondiale de la Santé pour permettre la comparaison des résultats entre les techniques de PCR disponibles (16). Il est intéressant de noter que la corrélation entre la charge virale et la gravité de la maladie ne soit pas claire, étant suggéré dans certaines cohortes, mais pas dans d'autres, peut-être en raison des caractéristiques des patients distincts, génotypes viraux et des erreurs dans la quantification (11, 16, 59, 62).

1.8.2. Evaluation de la maladie

Le classement de la maladie et la mise en place du diagnostic hépatique doivent être effectués chez tous les patients infectés par le VHD, afin de pondérer les risques et les avantages du traitement par l'interféron. La biopsie du foie, n'est pas nécessaire pour établir le diagnostic de l'infection par le VHD, mais il reste l'étalon pour le diagnostic hépatique. La détection de l'antigène delta est réalisée dans la plupart des centres de traitement avant l'examen de la biopsie (62). Bien que les méthodes non-invasives pour l'évaluation de la fibrose soient de plus en plus utilisées pour d'autres types d'hépatite (la plupart du temps de l'infection par le VHC), leur utilisation dans l'hépatite delta attend toujours la validation. L'élastographie du foie a été utilisé par différents groupes pour l'évaluation de la fibrose non-invasive du VHB/VHD/VIH chez le patient infecté, bien que des études de validation (chez les patients infectés par le VHD) doivent être effectuées (63, 64). De plus, les scores cliniques actuellement utilisés comme marqueurs indirects de la fibrose et les prédicteurs de résultats, ne sont pas validés chez les patients atteints d'hépatite delta. Une partie de ces scores a montré une mauvaise performance dans une cohorte d'hépatite delta. L'avènement du score Anticipation (BEA) a été fondé sur l'âge, le sexe, l'origine géographique, la numération plaquettaire et de la bilirubine. Il a été proposé par international Normalized Ratio (16).

1.8.3. Co-infection VHB-VHD

L'infection simultanée par le VHD et VHB a été associée à une maladie hépatique aigue plus sévère et même à une insuffisance hépatique. Dans la grande majorité des cas, la co-infection B/D entraîne une clairance des deux infections (26). La co-infection VHB et VHD est responsable d'une hépatite modérée évoluant le plus souvent vers l'élimination du VHB et du VHD. La présence des acides nucléiques (ADN du VHB, ARN du VHD) et celle des antigènes (AgHBs et AgHD) sont contemporaines du pic de transaminases. Il s'ensuit une augmentation rapide du titre des anticorps anti-HD totaux et de type IgM, les anticorps IgM anti-HBc associés à l'ADN du VHB témoignant de l'infection aiguë B. En cas de co-infection peu sévère, la virémie VHD est faible et la réponse anticorps IgM et IgG est rapide mais de faible ampleur, suggérant la résolution de l'infection VHB-VHD. Les anticorps IgG anti-HD peuvent persister, témoignant d'une infection ancienne résolutive (65).

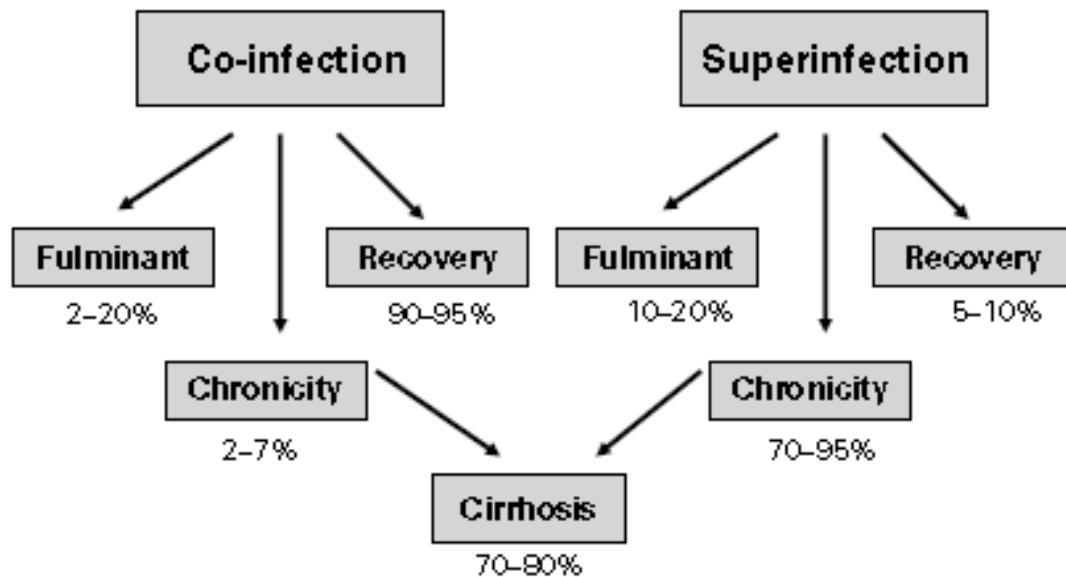


Figure 6: Résultat de la co-infection et surinfection du VHD par rapport au risque de développer l'hépatite fulminante, la chronicité et la cirrhose (18).

1.8.4. Surinfection VHB-VHD

La surinfection des porteurs d'AgHBs positifs peut conduire à une hépatite aiguë, mais elle progresse souvent vers une infection persistante. La surinfection par le VHD peut conduire à une suppression transitoire ou continue de la réplication du VHB (26). La surinfection par le VHD est caractérisée par une hépatite aiguë sévère avec des niveaux de virémie VHD et de transaminases (suivant le pic de virémie) très élevés. Elle est caractérisée par une augmentation rapide et importante des taux des anticorps anti-VHD IgM et IgG. En revanche, les anticorps IgM (anti-HBc) et l'ADN du VHB sont habituellement indétectables. Plus de 70% des cas de surinfection aiguë évoluent vers une hépatite D chronique dont le pronostic est sévère (65).

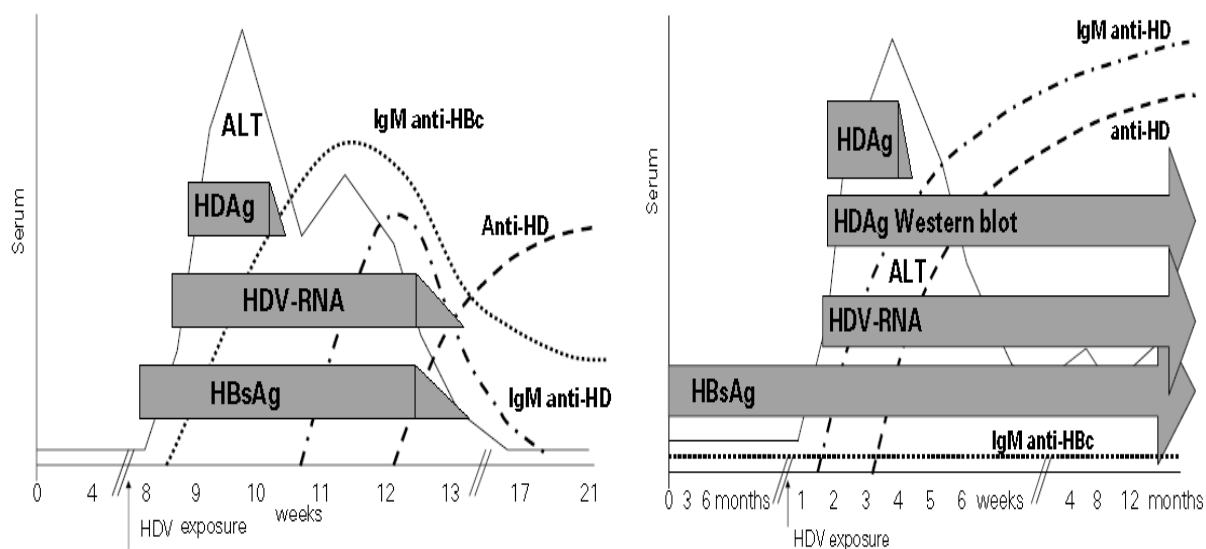


Figure 7: Sérologique et les changements biochimiques sériques associés à la co-infection du VHD aiguë (18).

1.8.5. Diagnostic de l'hépatite chronique D

L'hépatite chronique D se caractérise par la persistance de la virémie ainsi que des anticorps IgM et IgG anti-HD. On observe en général une inhibition de la répllication du VHB (65).

1.9. Histoire naturelle

Le VHD chronique est souvent considéré comme la forme la plus sévère de l'hépatite virale chronique. Les patients infectés par le VHD ont une évolution clinique plus agressive que les patients mono-infectés par VHB, avec trois fois plus de risques de développer une cirrhose et une progression plus rapide (66). Le risque de cirrhose a été signalé comme étant de 23%, 41% et 77% après respectivement 10, 20 et 30 ans d'infection (67). La décompensation clinique a été décrite comme la principale complication chez les patients cirrhotiques atteints d'hépatite chronique D, avec un risque deux fois plus accru par rapport au VHB mono-infection (68). Le cours de la maladie peut être influencée par le génotype du VHD, le génotype 1 prédominant étant associé à une maladie plus grave que les génotypes 2 et 4 (69). Le génotype 3 a été associé à une évolution particulièrement agressive (16). L'association entre les maladies coronariennes et le CHC est encore un sujet de débat. Trois grandes études identifient la décompensation et la mort hépatique comme la principale complication de la

maladie coronarienne, et non le CHC (16, 70). Cependant, dans la cohorte Euro Hep, un risque accru de 3,2 fois a été montré chez les patients coronariens par rapport à ceux qui ont une hépatite B chronique, avec un risque de 5 ans de 13% (68). Une étude suédoise récente a également suggéré une augmentation de 6 fois du risque de CHC chez les patients atteints de l'hépatite Delta. D'autres études sont encore nécessaires pour de nouvelles preuves du lien entre hépatite chronique D et CHC (16).

1.10. Prévention

La transmission du VHD peut être considérablement réduite par des mesures ciblant les principaux risques d'exposition. Comme pour d'autres virus transmissibles par le sang, les mesures de santé publique ont porté sur un examen strict du sang et des produits fractionnés. Pour le VHB, les mesures d'hygiène jouent un rôle important dans les pratiques visant à réduire la transmission chez les Personnes Utilisant des Drogues Intraveineuses (UDI) et la limitation de la transmission du VHD dans les pays à ressources limitées. Le vaccin contre le VHB est très efficace pour prévenir la transmission du VHD chez les patients naïfs et devrait être proposé à tous les contacts étroits des patients infectés par le VHD. Mais aucune stratégie immunoprophylactique n'existe pour la prévention de la super-infection du VHD chez les porteurs du VHB ; le vaccin contre le VHB ne provoque pas d'anti-HBs, la production d'anticorps chez ces patients. Malheureusement, les anticorps dirigés contre l'AgHD n'ont pas la capacité de neutralisation la forte infection par le VHD, empêchant ainsi toute utilisation du vaccin à base de l'AgHD. Cependant, il a été démontré que pour d'autres virus qui, bien que ne fournissant pas une immunité protectrice stérilisante, l'immunisation avec des protéines virales internes peuvent produire une réponse des lymphocytes T et empêcher la propagation du virus. In vitro les résultats étaient prometteurs comme la stimulation des cellules avec des peptides VHD qui conduit à une augmentation sur la production d'IFN gamma et l'activité cytotoxique T CD8. Cependant, chez la marmotte, la vaccination (soit par les protéines VHD, d'ADN ou de virus recombinants) n'a pas été efficace pour prévenir l'infection par le VHD des animaux naïfs, mais chez les porteurs chroniques du WHV. Bien que l'évolution de l'infection a été modifiée, son utilité reste encore à prouver. (16). Des études ont montré l'impact de la vaccination de contre le VHB qui agit sur la prévalence du VHD (71).

1.11. Traitement

Les essais avec l'interféron dans l'infection chronique par le VHD ont débuté dans les années 1980 (25). Il n'existe pas d'antiviraux spécifiques du VHD. Ceci s'explique par le fait que le virus ne code pas de protéines avec une activité enzymatique. Une meilleure compréhension du cycle de multiplication est nécessaire afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. L'interféron alpha (standard et forme pégylée) reste le seul médicalement recommandé par les sociétés savantes internationales pour le traitement de l'hépatite chronique delta. Une réponse virologique soutenue est observée chez 15 à 50% des patients. Les mécanismes moléculaires de l'action antivirale de l'interféron sur le VHD restent méconnus. L'intérêt des analogues nucléos(t)idiques anti-VHB en association avec l'interféron est largement discuté. Néanmoins, de nouvelles molécules sont actuellement en développement. Il s'agit des inhibiteurs d'entrée, des inhibiteurs de l'assemblage et des agents capables de moduler l'immunité (65, 72). Bien que l'interféron soit utilisé, il est difficile d'interpréter et de comparer les résultats des essais avec l'interféron en raison de différents points d'extrémité et de différentes durées ou doses d'interférons. La réponse thérapeutique est habituellement décrite comme la normalisation de l'alanine aminotransférase (ALAT) sérique et la clairance du sérum du VHD. Cette réponse varie largement et se produit à des moments différents pendant le traitement ou parfois après l'arrêt du traitement par l'interféron (25).

2. OBJECTIF DU MEMOIRE:

Objectif général

- Contribuer à la connaissance de la prévalence du VHD et les génotypes prédominants au Sud Togo ainsi que leur distribution et les facteurs avec lesquels ils sont associés.

Objectifs spécifiques :

- Montrer l'association entre les facteurs de risque de la transmission et le VHD ;
- Quantifier les charges virales (ARN du VHD) chez les patients dont la sérologie était positive pour le VHD ;
- Analyser phylogéniquement les souches de VHD circulant au Togo.

MATERIELS
ET
METHODES

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Cadre d'étude

Ce travail a été effectué à :

L'ONG ASADH (*Association Sauvons l'Afrique Des Hépatites*) en collaboration avec le laboratoire **Bio-Gene Institute (IBG)** à Lomé-Togo et dans le **LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-HYGIENE** «125 RUE DE STALINGRAD 93009 BOBIGNY CEDEX BATIMENT LAVOISIER - PORTE 17, 2EME ETAGE UFR SANTE MEDECINE BIOLOGIE HUMAINE 74 AVENUE MARCEL CACHIN 93012 BOBIGNY» Unité de virologie Avicenne Virus de l'Hépatite Delta, Laboratoire associé au CNR de Hépatites B, C et Delta.

3.2. Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective qui s'est déroulée de Janvier 2015 à Décembre 2015. Un dépistage des hépatites B à l'aide de tests rapides d'orientation diagnostique (TRD) a été proposé après un entretien. Le consentement de chaque participant a été recueilli.

3.3. Matériels et réactifs de Laboratoire

Automates : Chaîne ELISA (Statax); Abbott (m2000rt version 5 et m2000sp version 6.0) ; ROCHE Cobas/TaqMan version 2; Genetic Analyzer v.2 ; 2720 ThermalCycler (Applied Biosystems) et Red (Alpha Innotech), Eurobio.

Cartouches de réactif pour Abbott m2000rt et trousse Diasorin, réactifs de biologie moléculaire pour la détermination des séquences nucléotidiques.

3.4. Méthode d'étude

3.4.1. Population d'étude

Tous les sujets reçus en conseil de dépistage volontaire (CDV) à l'ONG ASADH, ayant une sérologie positive pour le VHB à l'aide de TRD ont été invités à donner leur consentement éclairé (confère annexe) afin de participer à la présente étude.

Ainsi, 119 sujets porteurs du VHB ont été recrutés pour cette étude et ont accepté un prélèvement sanguin au pli du coude.

3.4.2. Critères d'inclusion

Sujets séropositifs pour le VHB, sans distinction de sexe, reçus en visite de suivi dans le centre. Sujets de nationalité Togolaise ou ayant vécu au moins pendant 2 ans au Togo.

3.4.3. Critères d'exclusion

Sujets recevant un traitement antiviral pour leur hépatite virale

Sujets non dépistés positifs pour le VHB à l'aide d'un TRD.

3.4.4. Paramètres étudiés et recueil des données

Les données sociodémographiques suivantes ont été recueillies : âge, sexe, statut matrimonial et certains facteurs de risques. Les analyses sérologiques et moléculaires à partir des prélèvements sanguins ont été réalisées au laboratoire de virologie de l'hôpital Avicenne. Un questionnaire a permis de recueillir le consentement éclairé des enquêtés, de même que les autres paramètres (cf annexe 1 et 2). Les données recueillies ont fait l'objet d'un traitement informatique, d'une analyse statistique à l'aide du logiciel SPSS® 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Les résultats ont été discutés à la lumière de la littérature.

3.5. Méthodes Virologiques

3.5.1. Marqueurs Sérologiques du VHB, VHD et du VHC

La recherche de l'AgHBs et des anticorps anti-VHC ont été réalisées par l'intermédiaire d'un test rapide (TROD) « HEALTH MATE Rapid® » à partir du sang total capillaire prélevé après auto-piqûre au bout du doigt. Pour les patients dépistés positifs ayant accepté la convocation, les marqueurs sérologiques suivants ont été recherchés voir quantifier à l'aide d'un prélèvement sanguin au pli du coude :

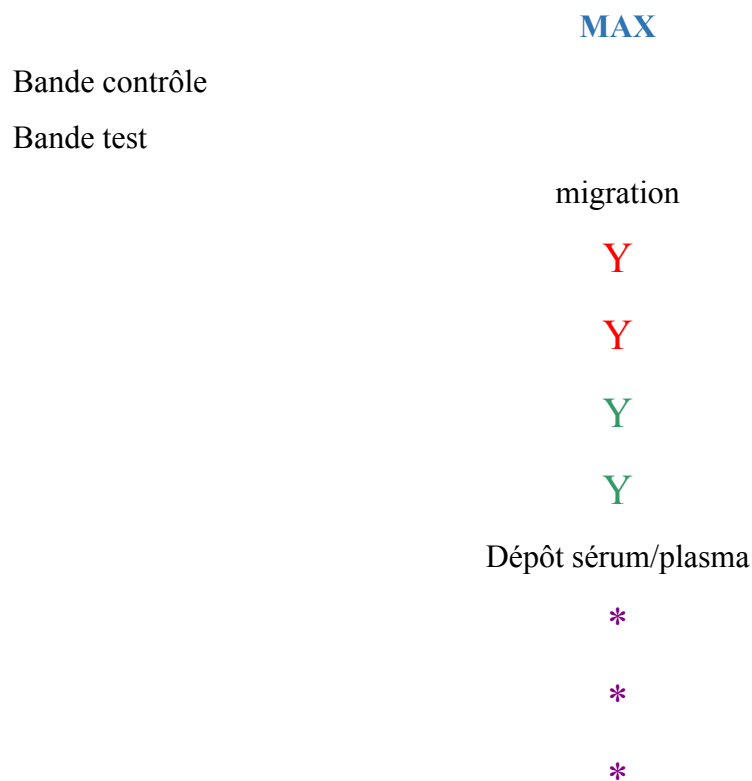
- pour le VHB : détection de l'AgHBs, détection des anticorps totaux anti-HBc et évaluation du titre des anticorps anti-HBs;
- pour le VHD : détection des anticorps anti-VHD.

L'ensemble de ces paramètres a été évalué à l'aide de techniques ELISA automatisées. L'ensemble du travail a été effectué à l'ONG ASADH et le laboratoire de virologie de l'hôpital d'Avicenne pour l'évaluation des paramètres sérologiques et moléculaires du VHD.

3.5.2. Principe des tests rapide d'orientation diagnostique (TROD) HEALTH MATE Rapid®

Le principe des tests rapides d'orientation diagnostique HEALTH MATE Rapid® HBV et HCV est basé sur une technique immunochromatographique qualitative. Lors du dépôt du sang total sur la membrane les antigènes viraux ou les anticorps anti-virus, présents dans

l'échantillon vont migrer, puis se fixer sur les particules d'or colloïdal recouvertes de protéine A de staphylococcus aureus (affinité particulière pour les Ig) et rencontrer les anticorps dans le cas de la recherche d'un antigène, ou les antigènes recombinants dans le cas de la détection d'anticorps. Lors de la rencontre antigène/anticorps un agglomérat de particules recouvertes de protéine A se forme, créant ainsi une bande colorée visible à l'œil nu. La bande contrôle réagit de la même manière en formant un complexe anti-anticorps humain (sur la membrane) /anticorps humain (présent dans l'échantillon).



Particules recouvertes de protéine A

Anticorps anti-anticorps humain

Antigènes recombinant du HCV

Figure 8: Exemple du test HEALTH MATE Rapid ® HBV (13)

3.5.3. Principe des tests sérologiques qualitatifs sur ELISA Statax

Cet automate utilise une technique d'immunodosage immunométrique, incluant une réaction simultanée de l'Ag ou l'Ac, présent dans l'échantillon, avec l'Ag ou l'Ac présent dans les puits. Les complexes antigène/anticorps sont fixés par la streptavidine revêtant les puits. Le conjugué marqué à la peroxydase de raifort (HRP) se lie à l'Ag ou l'Ac formant ainsi un « sandwich ». Les substances non liées sont éliminées par lavage. Un réactif contenant des substrats luminogènes et un agent de transfert d'électrons est ajouté dans les puits. La HRP du conjugué lié, catalyse l'oxydation du dérivé du luminol, produisant ainsi de la lumière. L'agent de transfert d'électrons (un acétanilide substitué) amplifie le signal lumineux émis et en prolonge l'émission. Les signaux lumineux sont lus par le système.

3.5.4. Principe de méthode ELISA pour la détection des anticorps anti-VHD

La détection des anticorps anti-VHD est basée sur une technique de compétition immuno-enzymatique. Les anticorps anti-VHD présents dans l'échantillon entrent en compétition avec les anticorps anti-VHD-HRP présents dans le milieu vis-à-vis d'une quantité fixe et connue d'antigène VHD liés à la phase solide. La quantité de traceur enzymatique liée à la phase solide, et par conséquent l'activité enzymatique, est inversement proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-VHD présente dans l'échantillon. La mesure de l'activité enzymatique s'effectue après addition d'une solution incolore de chromogène/substrat qui, sous l'action de l'enzyme, donne une coloration détectable au spectrophotomètre. Les critères de validation de la technique sont les suivants : La valeur de l'absorbance du blanc doit être comprise entre 0,000 et 0,15nm. Le calcul de la valeur seuil= $0,5CNx + 0,5CPx$. [0,5 de la moyenne de la valeur d'absorbances des témoins négatifs (CNx) + de la moyenne de la valeur d'absorbances des témoins positifs (CPx)]. $0,000 \leq \text{Blanc} \leq 0,150$, $CNx \geq 0.600$, $CPx \leq 0,080$, $CNx - CPx \geq 0$. La présence ou l'absence des anticorps anti-delta est déterminée en comparant la valeur d'absorbance des échantillons avec la valeur seuil

Valeur d'absorbance échantillon \leq valeur seuil \rightarrow **Echantillon Positif**

Valeur d'absorbance échantillon \geq valeur seuil \rightarrow **Echantillon Négatif.**

4. Marqueurs moléculaires du VHD

Chez les patients porteurs de l'AgHBs-positif, les marqueurs moléculaires suivants ont été recherchés à l'aide d'un prélèvement sanguin au pli du coude :

- Pour le VHD : détection-quantification de l'ARN du VHD, détermination du génotype chez les sujets ayant un ARN du VHD positif.

5. Technique de quantification des acides nucléiques

5.1. Principe de la détection-quantification de l'ARN du VHD à l'aide de la plate-forme de PCR en temps réel *m2000* (Abbott)

La quantification de l'ARN du VHD passe par deux principes : RT-PCR qualitative et la PCR quantitative. Le principe est le même que celui énoncé dans la quantification de l'ARN du VHC.

6. Détermination des génotypes viraux

La détermination des génotypes est réalisée par analyse phylogénique d'une portion d'un gène après séquençage des produits d'amplification. Les séquences nucléotidiques ainsi générées sont comparées à des séquences de référence des différents génotypes disponibles dans les banques.

6.1. Principes

6.1.1. Principe de l'extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ARN du virus hépatite Delta est une technique automatisée qui se réalise par l'automate « *m2000sp* » *ABBOTT*.

L'extraction se déroule en 4 étapes :

- Etape de lyse : l'échantillon est mis en contact avec un tampon de lyse afin de lyser les virus et de libérer les acides nucléiques viraux ;
- Etape de liaison : des particules magnétiques sont ajoutées au milieu réactionnel, les acides nucléiques se lient à ces particules polarisées ;
- Etape de lavage : les particules magnétiques sont séparées du premier milieu réactionnel et placées dans un second milieu afin de réaliser des lavages en tampon alcoolique ;

- Etape d'éluion : la polarité du milieu réactionnel change lors des lavages successifs, libérant ainsi les acides nucléiques purifiés à partir des particules magnétiques. Celles-ci sont alors éliminées du milieu et le produit final est élué.

6.1.2. Principe de la RT-PCR one step

La première étape consiste à synthétiser une chaîne d'ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'une matrice d'ARN, et ce par l'action d'une enzyme la transcriptase inverse issue des rétrovirus. La seconde étape consiste à synthétiser des ADN double brin grâce à l'action d'une Taq polymérase. L'opération est répétée de nombreuses fois afin d'amplifier la cible en grande quantité.

6.1.3. Principe de la PCR nichée

Le principe est grossièrement le même que celui énoncé précédemment et permet d'augmenter la sensibilité de la PCR en utilisant un couple d'amorces internes à celui utilisé dans la RT-PCR.

7. Visualisation des produits d'amplification

Après l'amplification, les acides nucléiques sont visualisés après migration des produits d'amplification dans un gel d'agarose en présence d'un agent intercalant (acridine orange). La migration des produits de PCR permet d'apprécier la taille du produit amplifié par comparaison à un marqueur de taille de poids moléculaire dont la taille des différents fragments est connue et la qualité du fragment amplifié.

8. Purification des acides nucléiques

Une étape de purification des acides nucléiques est nécessaire précédant la réaction de séquence. Cette purification s'effectue sur une membrane de silice. Cette membrane a la propriété de retenir les acides nucléiques d'une taille au moins égale à 100 paire de bases. Les autres constituants de la PCR tels que tampon, enzyme, amorces, vont être éliminés par lavages.

9. Principe du séquençage selon la méthode de SANGER

La réaction de séquençage, basée sur la méthode Sanger établie en 1977, a été réalisée avec la trousse BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies).

La réaction de Sanger est une succession de cycle de polymérisation au cours desquels l'ADN incorpore soit un désoxyribonucléotide (dA, dC, dG et dT) ou un didésoxyribonucléotides (ddA, ddC, ddG et ddT) marqué par un fluorochrome en fonction du brin matrice par complémentarité des bases. Chaque ddN est marqué à un fluorochrome différent. Au cours de la réaction de séquençage, une seule amorce est ajoutée au milieu réactionnel à partir duquel la synthèse sera initiée. Lorsqu'elle incorpore un désoxyribonucléotide la synthèse continue, mais lorsqu'elle incorpore un didésoxyribonucléotide, la synthèse s'arrête car le didésoxyribonucléotide est dépourvu du groupement hydroxyle qui permet de former la liaison avec la base suivante. Ce qui permet d'obtenir des fragments de tailles différentes. Au lieu d'utiliser un gel ultra-résolutif pour différencier les fragments d'une paire de base, la lecture de l'enchaînement des bases est réalisée par un séquenceur automatique type capillaire qui permet la détection des quatre fluorochromes utilisés. La séquence nucléotidique ainsi obtenue est visualisable à partir d'un électrophorégramme qui est un enchaînement de pics des différents nucléotides représentés par une couleur différente. Chaque couleur est spécifique d'un des quatre nucléotides A, T, G et C.

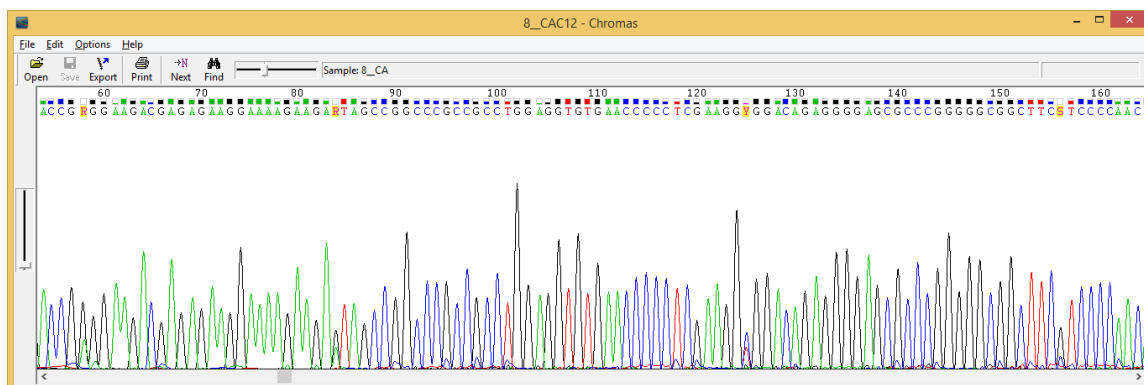


Figure 9: Photographie d'un électrophorégramme de séquençage

10. Analyse des séquences nucléotidiques

L'analyse des séquences nucléotidiques fait appel à l'utilisation de logiciels informatiques simple permettant :

- d'aligner les séquences obtenues avec des séquences de référence disponibles dans les banques de séquences
- de réaliser des études phylogéniques selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) pour la détermination des génotypes

Ainsi nous avons utilisé les logiciels BioEdit, Chromas, SeqScape, Sequence Navigator, PHYLIP, Njplot et FigTree respectivement pour la correction, l'alignement et la construction des arbres phylogéniques.

11. Détermination des génotypes du VHD

La détermination du génotype du VHD a consisté à l'amplification de la région R₀ selon la méthode publiée en 2001 par Valeria IVANIUSHINA et al., Pour la réalisation de la RT-PCR, deux mélanges réactionnels ont été faits : un pour la RT et l'autre pour la PCR. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Programme d'amplification

95°C pendant 5 min
 95°C pendant 30 sec
 58°C pendant 30 sec } *45
 72°C pendant 1 min
 72°C pendant 10 min.

Amorces	Séquence
GenoD S	5'-CATGCCGACCCGAAGAGGAAAG-3'
GenoD AS	5'-GAAGGAAGGCCCTCGAGAACAAGA-3'

SE: sens externe; ASE: anti-sens externe; Si: sens interne; ASi: anti sens interne

Y: C ou T; V: A, C, ou G; R: A ou G N: A, C, G ou T; M: A ou C.

RESULTATS

12. RESULTATS

Parmi les 4731 individus dépistés à l'aide d'un test de diagnostic rapide (TDR) au cours de l'année 2015, 606 (12,8%) sujets avaient un test positif pour le VHB. L'ensemble des individus dépistés positifs ont été convoqué pour une prise en charge de leur hépatite. Seuls 119 sujets ont répondu.

12.1. Caractéristiques démographiques de la population

Le tableau I présente les caractéristiques sociodémographiques de la population étudiée. Un total de 119 patients a été inclus. La moyenne d'âge était de 37,20 ans avec un [SD] \pm 10,39 ans dans l'intervalle de 18 à 66 ans. La répartition par classe d'âge montrait que la majorité des patients (>74%) était âgée de 18 à 36 ans. Comme attendu, la majorité (71,4%) des patients était des hommes. L'origine géographique des individus dépistés positifs pour le VHD, majorité (42,9%) était originaire de Kara, une région localisée au nord du Togo.

Tableau I : Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude

Caractéristiques	Effectif (N=119)
Sexe (n, %)	
Homme	71,4
Femme	28,6
Age (années)	
Moyenne	37,20
Intervalle	10,89(66-18)
Répartition par classe d'âge, n (%)	
< 25	10 (8,4)
25 -35	52 (43,7)
\geq35	57 (47,9)
Origine géographique, n (%)	
MARITIME	14,3 (17)
PLATEAUX	22,7 (27)
CENTRALE	9,2 (11)
KARA	42,9 (51)
SAVANE	10,9 (13)

12.2. Facteurs de risque de transmission

Tableau II: Facteurs de risque de transmission du VHD

	N(%) VHD+	N(%) VHD-	OR (95%)	P-value
Sexe				
Féminin	5(14,7)	29 (85,3)	1(référence)	
Masculin	12(14,1)	73 (85,9)	0,953 (0,308, 2,947)	0,934
Age groupe (décille)				
<25 ans	3 (30,0)	7 (70,0)	1(référence)	
25-35 ans	8 (15,4)	44 (84,6)	1,172 (0,418 ; 3,281)	0,763
≥35 ANS	6 (10,5)	51 (89,5)	0,545 (0,188 ; 1,587)	0,261
Statut matrimonial				
Célibataire	6 (19,4)	25 (80,6)	1(référence)	
Marié(e)	11 (12,5)	77 (87,5)	0,595(0,200 ; 1,774)	0,348
Zone d'habitation				
Urbain	14 (15,9)	74 (84,1)	1(référence)	
Rural	3 (9,7)	28 (90,3)	1,766 (0,471 ; 6,614)	0,394
Exposition parentérale				
Oui	7(12,7)	48(87,3)	1(référence)	
Non	10 (15,6)	54 (84,4)	0,788 (0,278 ; 2,231)	0,653
Histoire d'hospitalisation				
Oui	3(12,0)	22 (88,0)	1(référence)	
Non	14(14,9)	80 (85,1)	0,779 (0,205 ; 2,956)	0,713
Histoire de transfusion				
Oui	3 (20,0)	12 (80,0)	1(référence)	
Non	14 (13,5)	90 (86,5)	1,607 (0,402 ; 6,419)	0,499

Parmi les 119 sujets restants, 85 étaient des hommes et 34 femmes (sex ratio 2,5). Quarante-huit des 119 (73,95%) été des mariés. L'Ac anti-VHD a été détecté chez 17 patients sur 119 avec (14,28%, IC à 95% : 8,55 à 21,88%) AgHBs positifs. Lorsque les âges ont été regroupés en fonction de déciles, ce taux était de 30,0% chez les sujets âgés de moins de 25 ans (premier décile) et 15,4% chez les sujets âgés de plus de 25 à 35 ans (deuxième décile).

La présence d'au moins un risque d'exposition parentérale (tatouage, perçage, la circoncision, l'excision, l'injection avec une seringue en verre, infection nosocomiale, anti-bilharziose ou le traitement anti-tuberculose), histoire d'hospitalisation et de transfusion sanguine à VHD, n'ont pas été liées à la présence de l'Ac anti-VHD ($P = 0,653$, $P = 0,713$, $P = 0,499$). La prévalence de l'Ac anti-VHD ne diffère pas significativement selon la zone d'habitation $P=0,394$.

12.2. Hépatite B

La majorité des patients (84,03%) avait un ADN du VHB détectable, la presque totalité des patients avaient une charge virale supérieure à 2000 UI/mL (i.e $\geq 3,30$ Log UI/mL). Tous les patients étaient infectés par un génotype E. Le titre de l'AgHBs, mesuré par une méthode de chimioluminescence automatisée (Architect, Abbott), était en moyenne de $3,30 \pm 1,50$ Log UI/mL.

Tableau III: Caractéristiques virologiques des patients AgHBs-positif

Caractéristiques (N=119)	
ADN du VHB (Log UI/mL) (moy \pm DS)	3,30\pm1,50
ADN du VHB $\geq 3,30$ Log UI/mL, n (%)	100 (84,03%)
ADN du VHB $< 3,30$ Log UI/mL, n (%)	19 (15,97 %)
Titre de l'AgHBs (Log UI/mL) (moy \pm DS)	3,70\pm0,60
Génotype E, n (%)	119(100%)

12.3. Hépatite D

Chez les individus à l'AgHBs-positifs, la présence des anticorps anti-VHD a été évaluée à l'aide d'une trousse EIA Diasorin. Parmi les 119 patients à l'AgHBs-positif, 17 (14,3%) patients avaient des anticorps dirigés contre le VHD. Environ un tiers des individus séropositifs pour le VHD avait un ARN du VHD détectable. La charge virale moyenne était de $5,97 \pm 1,22$ Log copies/mL. Le génotype viral a été déterminé chez 13 des 17 patients ayant un ARN détectable. Tous les sujets étaient infectés par le génotype 1.

Tableau IV: Caractéristiques virologiques des patients séropositifs pour le VHD

Caractéristiques (N=119)	
ARN du VHD (Log cp/mL) (moy±DS)	5,97±1,22
Génotype (n=17)	
Répliquant	10 (58,82%)
Génotype 1	13 (100%)

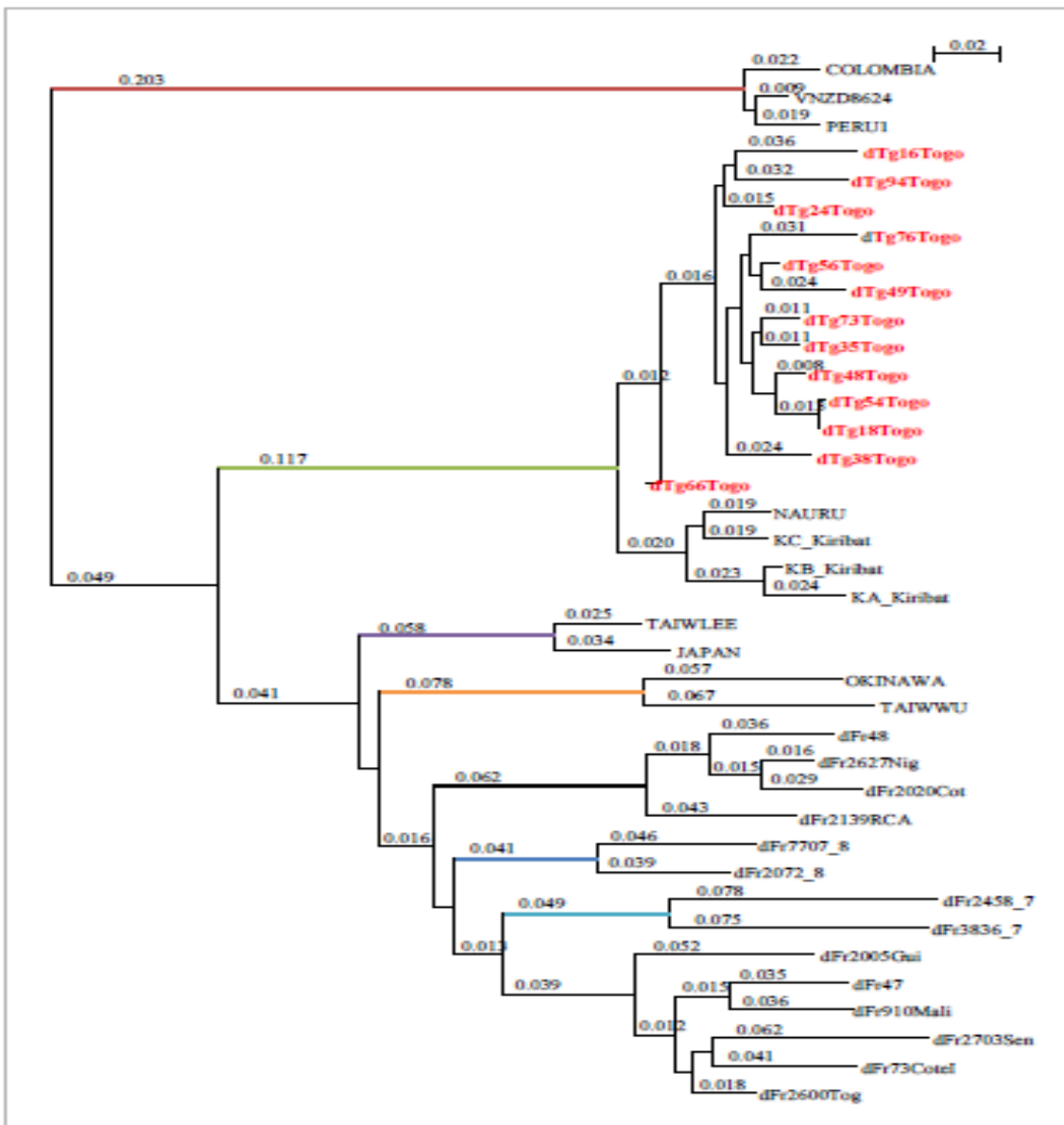


Figure 10: Analyse phylogénique des séquences nucléotidiques de la région R0 du VHD isolés dans la population du Sud Togo par comparaison à des séquences de référence disponibles dans les banques.

Légende :

VHD-1¹, VHD-2², VHD-3³, VHD-4⁴, VHD-5⁵, VHD-6⁶, VHD-7⁷, VHD-8⁸

- ¹ Génotype 1
- ² Génotype 2
- ³ Génotype 3
- ⁴ Génotype 4
- ⁵ Génotype 5
- ⁶ Génotype 6
- ⁷ Génotype 7
- ⁸ Génotype 8

DISCUSSION

13. DISCUSSION

L'hépatite delta constitue un problème majeur de santé publique dans le monde affectant 15-20 millions de personnes (73). La co-infection ou surinfection du VHD signifie que les cellules hépatiques de l'hôte sont déjà infectées par le virus de l'hépatite B. La co-infection ou la surinfection du VHD conduit à la cirrhose du foie et enfin au carcinome hépatocellulaire (CCH) ou cancer du foie (74). Notre étude montre une prévalence extrêmement élevée de l'infection du VHD au Sud Togo avec une prévalence de 14,28%. Cependant, il existe très peu d'étude sur la prévalence du VHD chez les patients asymptomatiques de l'AgHBs positive au Togo. La prévalence de 14,28% trouvée dans notre étude est supérieure à celle trouvées au Benin (34,8%) (75), à Dakar (Sénégal) (13%) et au Cameroun (10%) et inférieure à celle trouvée au Gabon (15,6%) chez les donneurs de sang (76). Concernant la prévalence selon l'âge, la moyenne d'âge des sujets au VHD positifs a été de cinq ans inférieur à celle de la population globale à AgHBs positive (**33,53** et **37,20**), ce qui est en faveur d'une surinfection B-delta plus fréquente que la co-infection dans la population étudiée. Ces éléments suggèrent des modes de transmission similaires, horizontal du VHB/VHD ; la voie sexuelle ou les voies parentérales liées à certaines pratiques, comme le tatouage ou la circoncision traditionnelle, qui sont les principaux modes de transmission de l'infection à VHB dans les zones endémiques (77).

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons utilisé la technique de la (RT) PCR pour l'amplification du génome du VHD pouvant servir d'examiner la charge virale et le génotypage du virus. Le génome viral a pu être amplifié pour 52,94 % des sujets à hépatite B chronique testés.

Notre étude a montré que les individus porteurs de l'AgHBs étaient infectés exclusivement par un génotype E. Le génotype, le plus fréquemment isolé en Afrique de l'Ouest (78). Ces résultats confirment les travaux de Folly et al., trouvés en 2015 dans une cohorte de la population Togolaise (13).

Le génotypage du VHD n'a pas encore de justification clinique ou thérapeutique étant donné l'absence de corrélation entre le génotype viral et la sévérité de l'infection, même si certaines études suggèrent que le génotype 2 donnerait généralement des lésions hépatiques moins sévères que le génotype 1. La caractérisation génomique et génotypique des souches virales est, néanmoins, fortement recommandée pour l'étude de l'épidémiologie moléculaire de l'infection dans un pays donné (77, 79, 80). Aucune donnée sur les génotypes du VHD n'est disponible au Togo selon les études de Folly et al., en 2015. Des données récentes ont montré

qu'il existait de fortes variations de la prévalence delta dans les différentes régions de l'Afrique Sub-saharienne (73, 81). Nous montrons pour la première fois que le génotype 1 du VHD était le génotype le plus fréquemment isolé au Sud Togo. Génotype ubiquitaire, largement distribuée à travers le monde (82). Des études élargies avec séquençage de plusieurs isolats viraux sont nécessaires pour savoir si le génotype 1 est le seul génotype circulant au Sud Togo, ou si d'autres génotypes co-circulent.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

14. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Bien que le Programme Elargi de la vaccination ait été introduit en 2008, le VHB reste un problème majeur de santé publique. Les voies de transmission horizontale et de la petite enfance étant les principales voies de l'infection du VHB en Afrique. La forte prévalence du VHB et du VHD observée dans notre étude justifie la mise en place d'un programme de vaccination national contre l'hépatite B (vaccination à J₀ des enfants) dans le cadre du Programme Elargi de Vaccination (PEV), afin d'assurer l'immunisation de tous les enfants âgés de moins d'un an d'une part et de faciliter l'accès au traitement antiviraux d'autre part. En effet, des traitements très efficaces et bien tolérés sont désormais disponibles. Malheureusement, ils ne sont généralement pas disponibles au Togo excepté pour certaines populations en particulier les sujets co-infectés par le VIH/VHB qui bénéficient de la mise à disposition du ténofovir.

Les résultats fournis par cette étude permettent d'envisager les perspectives suivantes :

- Etudier l'implication du VHD dans la progression du VHB chez les patients co-infectés et surinfectés.
- Etudier les mécanismes du cercle roulant du VHD, ainsi que l'horloge moléculaire du VHD en Afrique au Sud du Sahara.

15. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Mehwish Riaz MI, Hifza Kanwal and Firoz Kabir. An overview of Triple infection with Hepatitis B, C and D viruses. *Virology Journal* 2011;8(368).
2. Wael Mansour F-ZFM, Ahmad Sidiya, Elkhilil Ishagh, Mariama Abdou Chekaraou, Pascal Veillon, Alexandra Ducancelle, Ségolène Brichtler, Frédéric Le Gal, Baidy Lo, Emmanuel Gordien, and Françoise Lunel-Fabiani. Prevalence, Risk Factors, and Molecular Epidemiology of Hepatitis B and Hepatitis Delta Virus in Pregnant Women and in Patients in Mauritania. *Journal of Medical Virology* 2012;84:1186-98
3. WHO. July 2015.
4. Gaeta GB RM, Sardaro C, Spadaro A, Chionne F, Freni AM, Ajello A, Costantino A, Giusti G. Prevalence of anti-HCV antibodies in patients with chronic liver disease and its relationship to HBV and HDV infections. *Infection* 1990;277-9(5):18.
5. Giovanna Fattovich AT, Lucio Brollo, Giuliano Giustina, Patrizia Pontisso, Giuseppe Realdi, Alfredo Alberti and Arturo Ruol. Hepatitis C Virus Infection in Chronic Hepatitis B Virus Carriers. *Journal of Infectious Diseases*. 1991;163:400-2.
6. Sheng-Nan Lu T-MC, Chuan-Mo Lee, Jing-Houng Wang, Hung-Da Tung, and Jaw-Ching Wu. Molecular Epidemiological and Clinical Aspects of Hepatitis D Virus in a Unique Triple Hepatitis Viruses (B, C, D) Endemic Community in Taiwan. *J Med Virol* 2003;70:74-80.
7. Michele Soares Gomes-Gouvea MdCPS, Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho Mello, Elisabete Maria Figueiredo Brito, Lizomar de Jesus Maue' s Pereira Moia, Gilberta Bensabath, Heloisa Marceliano Nunes , Flair Jose' Carrilho, João Renato Rebello Pinho. Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin *Acta Tropica*. 2008;106:149–55.
8. Myuki Alfaia Esashika Crispim NAF, Sonia Cordeiro Campello, Nicolaus Albert Schriefer, Mariane Martins Araújo Stefani and Dagmar Kiesslich. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infectious Diseases*. 2014;14(94).
9. Antonio Madejón MR, Ángela Hernández, Araceli García-Sánchez, Marta Sánchez-Carrillo, Antonio Olveira, Javier García-Samaniego. Hepatitis B and D viruses replication interference: Influence of hepatitis B genotype. *World J Gastroenterol* 2016;22(11):3165-74.

10. Meifang Han ML, Lilly Yuen, Rosalind Edwards, Uma Devi, Scott Bowden, QinNing, Stephen Locarnini, Kathy Jackson. Molecular epidemiology of hepatitis delta virus in the Western Pacific region. *Journal of Clinical Virology*. 2014;61:34–9.
11. Wornei Silva Miranda Braga MdCC, Fabiane Giovanella Borges, Jorge Roberto Di Tommaso Leão, Ana Cristina de Souza Martinho, Ivo Seixas Rodrigues, Eliete Pereira de Azevedo, Gildo Maia de Barros Júnior and Raymundo Paraná. Hepatitis D virus infection in the Western Brazilian Amazon - far from a vanishing disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2014;45(6):691-5.
12. Kate El Bouzidi WE, Katharina Kranzer, Dianne N. Irish, Bridget Ferns, Patrick Kennedy, William Rosenberg, Geoffrey Dusheiko, Caroline A. Sabin, Belinda C. Smith, Eleni Nastouli. Hepatitis delta virus testing, epidemiology and management: A multicentre cross-sectional study of patients in London. *Journal of Clinical Virology*. 2015;66:33–7.
13. Folly A. Epidémiologie Moléculaire des Hépatites Virales B, C et Delta au Togo 2015.
14. M. RIZZETTO MGC, S. ARICO, O. CRIVELLI, C. TREPO, F. BONINO, AND G. VERME. Immunofluorescence detection of new antigenantibody system (S/anti-5) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*. 1977;18:997-1003.
15. Naomi Hall LNT, Trinh Do Thi Diem, Allison Waters, Linda Dunford, Jeff Connell, Michael Carr, William Hall, Lan Anh Nguyen Thi. High Prevalence of Hepatitis Delta Virus among Persons Who Inject Drugs, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21.
16. Dulce Alfaiate PD, David Durantel Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Res*. 2015;122:112–29.
17. Taylor. JM. Replication of human hepatitis delta virus: recent developments. *TRENDS in Microbiology*. 2003;11:185.
18. HOWARD THOMAS SL, ARIE ZUCKERMAN. Viral Hepatitis "Section VI Hepatitis D Virus": 3; 2005.
19. Sarah A Hughes HW, Phillip M Harrison. Hepatitis delta virus. *Lancet*. 2011;378(9785):73-85.
20. Iris E. Andernach LVL, Zekiba S. Tarnagda, Marc C. Tahita, Jesse A. Otegbayo, Joseph C. Forbi, Sunday Omilabu, Ionela Gouandjika-Vasilache, Narcisse P. Kommas, Okwen P. Mbah, Claude P. Muller. Characterization of Hepatitis Delta Virus in Sub-Saharan Africa. *Journal of Clinical Microbiology* 2014;52:1629-36.
21. Pelchat JTaM. Origin of hepatitis d virus. *Future microbiology*. 2010;5(3):393-402.

22. Frédéric Le Gal EG, Marie-Pierre, Ripault, Jeanne Serpaggi, Jean-Claude, Trinchet, Emmanuel Gordien, and Paul Dény. Eighth Major Clade for Hepatitis Delta Virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2006;12(9).
23. Zaigham Abbas MA, Sarim Abbas, Lubna Shazi. Hepatitis D and hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2015;7(5):777-86.
24. http://education.expasy.org/images/Deltavirus_virion.jpg. 2016-03-23.
25. Gunsar F. Treatment of delta hepatitis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11(5):489-98.
26. HOWARD C. THOMAS ASFL, STEPHEN A. LOCARNINI, ARIE J. ZUCKERMAN. Viral Hepatitis "Section V Hepatitis D Virus". 2014. p. 393-402.
27. Carolina Alves CB, and Celso Cunha. Hepatitis Delta Virus: A Peculiar Virus. *Adv Virol*. 2013;2013.
28. Taylor. JM. Hepatitis delta virus. *Virology*. 2006;344:71 – 6.
29. Zaigham Abbas RA. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. *World J Hepatol* 2013;5(12):666-75.
30. ANTONINA SMEDILE FR, GIORGIO SARACCO, ELISABETTA CHIABERGE, VALTER LATTORE, ANTONINA FABIANO, MAURIZIA R. BRUNETTO, GIORCIO VERME, MARIO RIZZETTO AND FERRUCCIO BONIN. Hepatitis B Virus Replication Modulates Pathogenesis of Hepatitis D Virus in Chronic Hepatitis D HEPATOLOM. 1991;13 (3).
31. Wenhui He BR, Fengfeng Mao, Zhiyi Jing, Yunfei Li, Yang Liu, Bo Peng, Huan Yan, Yonghe Qi, Yinyan Sun, Ju-Tao Guo, Jianhua Sui, Fengchao Wang, Wenhui Li. Hepatitis D Virus Infection of Mice Expressing Human Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide. *PLoS Pathog* 2015;11(4).
32. Gulshan Zaidi MI, Fayyaz Ahmed Malik, Irum Amin, Muhammad Shahid, Saima Younas, Rashid Hussain, Zunaira Awan, Aaliyah Tariq, Khalida Parveen. Prevalence of hepatitis delta virus infection among hepatitis b virus surface antigen positive patients circulating in the largest province of pakistan. *Virology Journal*. 2010;7(1):283.
33. Negro. SPaF. Hepatitis D virus: an update. *Liver International*. 2010;31(1):7–21.
34. Chao M. RNA recombination in hepatitis delta virus: Implications regarding the abilities of mammalian RNA polymerases. *Virus Research* 2007;127:208-15.
35. Chao YC TH, Hsu CT. Evolution rate of hepatitis delta virus RNA isolated in Taiwan. *J Med Virol* 1994;43(4):397-403.

36. Lee CM BF, Chao YC, Govindarajan S, Lai MM. Evolution of hepatitis delta virus RNA during chronic infection. *Virology*. 1992;188(1):265-73.
37. Deny P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;307:151-71.
38. Gareth M. Jenkins AR, Oliver G. Pybus, Edward C. Holmes. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol* 2002;54(2):156-65.
39. Jinhong Chang SOG, and John M. Taylor. Evolution of Hepatitis Delta Virus RNA Genome following Long-Term Replication in Cell Culture. *JOURNAL OF VIROLOGY*. 2005;79(21):13310-6.
40. Chao. T-CWaM. RNA Recombination of Hepatitis Delta Virus in Natural Mixed-Genotype Infection and Transfected Cultured Cells. *JOURNAL OF VIROLOGY* 2005;79(4):2221-9.
41. B. T. Sy HMN, N. L. Toan, L. H. Song, H. V. Tong, C. Wolboldt, V. Q. Binh, P. G. Kremsner, T. P. Velavan, and C.-T. Bock. Identification of a natural intergenotypic recombinant hepatitis delta virus genotype 1 and 2 in Vietnamese HBsAg-positive patients. *J Viral Hepat* 2015;22(1):55-63.
42. SEVERIN O. GUDIMA JC, and JOHN M. TAYLOR. Reconstitution in cultured cells of replicating HDV RNA from pairs of less than full-length RNAs. *RNA* 2005;11(1):90-8.
43. Nadja Radjef EG, Valeria Ivaniushina, Elyanne Gault, Patricia Anais, Tudor Drugan, Jean-Claude Trinchet, Dominique Roulot, Mathieu Tamby,, Michel C. Milinkovitch aPD. Molecular Phylogenetic Analyses Indicate a Wide and Ancient Radiation of African Hepatitis Delta Virus, Suggesting a Deltavirus Genus of at Least Seven Major Clades. *JOURNAL OF VIROLOGY*. 2004;78:2537-44.
44. M. S. Gomes-Gouve MCPS, G. Bensabath, I. M. V. G. de Carvalho-Mello, E. M. F. Brito, O. S. C. Souza, A. T. L. Queiroz, F. J. Carrilho¹ and J. R. R. Pinho. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *Journal of General Virology* 2009;90: 2638–43.
45. Maria Makuwa AM-N, Sandrine Souquière, Dieudonné Nkoghé, Eric M. Leroy, and Mirdad Kazanji. Prevalence and Molecular Diversity of Hepatitis B Virus and Hepatitis Delta Virus in Urban and Rural Populations in Northern Gabon in Central Africa. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 2009;47:2265-8.

46. Brook MG. Sexual transmission and prevention of the hepatitis viruses A-E and G. *Sex Transm Infect* 1998;74(6):395-8.
47. Grazia A Niro, John L Casey, Eleonora Gravinese, Maria Garrubba, Pasquale Conoscitore, Evangelista Sagnelli, Marilena Durazzo, Nicola Caporaso, Francesco Perri, Gioacchino Leandro, Domenico Facciorusso, Mario Rizzetto, Angelo Andriulli. Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence. *J Hepatol* 1999 30(4):564-9.
48. Yurdaydin C IR, Bozkaya H, Bozdayi AM. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. *J Viral Hepat.* 2010;17(11):749-56.
49. Patrizia Farci GAN. Clinical Features of Hepatitis D. *Semin Liver Dis* 2012;32(03): 228-36.
50. Caredda F OG, Antinori S, Re T, Zampini L, Moroni M. Simultaneously acquired hepatitis B and hepatitis D virus infections. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985 6(291):51-2.
51. Ottobrelli A1 MA, Smedile A, Recchia S, Salizzoni M, Cornu C, Lamy ME, Otte JB, De Hemptinne B, Geubel A, et al. Patterns of hepatitis delta virus reinfection and disease in liver transplantation. *Gastroenterology* 1991;101(6):1649-55.
52. ANTONINA SMEDILE JLC, PAUL J. COTE, MARILENA DURAZZO, BRUNA LAVEZZO, ROBERT H. PURCELL,, MARIO RIZZETTO AJLG. Hepatitis D viremia following orthotopic liver transplantation involves a typical HDV virion with a hepatitis B surface antigen envelope. *Hepatology* 1998;27(6):1723-9.
53. Moestrup T HB, Widell A, Nordenfelt E. Clinical aspects of delta infection. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;286(6359):87-90.
54. Sarah A Hughes HW, Phillip M Harrison. Hepatitis delta virus. *Lancet*. 2011;378:73–85.
55. Gish. MNR. Hepatitis Delta: Epidemiology, Diagnosis and Management 36 Years After Discovery. *Curr Gastroenterol Rep*. 2014;16(365).
56. ESAL. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 2012;57(1):167-85.
57. Antonella Olivero AS. Hepatitis Delta Virus Diagnosis. *Semin Liver Dis* 2012;32(3):220-7.
58. Anika Wranke BH, Stefanie Ernst, Beatriz Calle Serrano, Florin Alexandru Caruntu, Manuela Gabriela Curescu, Kendal Yalcin, Selim Gurel, Stefan Zeuzem, Andreas Erhardt, Stefan Luth, George V. Papatheodoridis, Birgit Bremer, Judith Stift, Jan Grabowski, Janina Kirschner, Kerstin Port, Markus Cornberg, Christine S. Falk, Hans-Peter Dienes, Svenja

Hardtke, Michael P. Manns, Cihan Yurdaydin, Heiner Wedemeyer and HIDIT-2 Study Group. Anti-HDV IgM as a Marker of Disease Activity in Hepatitis Delta. PLoS ONE 2014;9(7):e101002. doi:10.1371/journal.pone.0101002

59. SÉGOLÈNE BRICHLER FLG, AFIFAA BUTT, SYLVIE CHEVRET, EMMANUEL GORDIEN. Commercial Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays Can Underestimate or Fail to Quantify Hepatitis Delta Virus Viremia. CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY 2013;11:734–40.

60. R.B. Ferns EN, J.A. Garson. Quantitation of hepatitis delta virus using a single-step internally controlled real-time RT-qPCR and a full-length genomic RNA calibration standard. Journal of Virological Methods. 2012;179(1):189-94.

61. Homs M GK, Blasi M, Lütgehetmann M, Buti M, Esteban R, Dandri M, Rodriguez-Frias F. Relevance of a full-length genomic RNA standard and a thermal-shock step for optimal hepatitis delta virus quantification. J Clin Microbiol 2014;52(9):3334-8.

62. Wedemeyer H MM. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010;7(1):31-40.

63. Castellares C BP, Martín-Carbonero L, Labarga P, Vispo ME, Casado R, Galindo L, García-Gascó P, García-Samaniego J, Soriano V. Liver cirrhosis in HIV-infected patients: prevalence, aetiology and clinical outcome. J Viral Hepat 2008;15(3):165-72.

64. Soriano V VE, Sierra-Enguita R, Mendoza Cd, Fernández-Montero JV, Labarga P, Barreiro P. Efficacy of prolonged tenofovir therapy on hepatitis delta in HIV-infected patients. AIDS 2014;28(16):2389-94.

65. Dhumeaux. D. Prise en charge des personnes infectées par les virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C "RAPPORT DE RECOMMANDATIONS 2014". Groupe EDP Sciences ed2014.

66. Fattovich G BS, Noventa F, Pornaro E, Stenico D, Alberti A, Ruol A, Realdi G. Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. J Infect Dis 1987;155(5):931-5.

67. C. Yurdaydin RI, H. Bozkaya and A. M. Bozdayi. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. Journal of Viral Hepatitis. 2010;17:749-56.

68. Fattovich G GG, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. Gut 2000;46(3):420-6.

69. CHIEN-WEI SU YHH, TEH-IA HUO, HSUAN HUI SHIH, I-JANE SHEEN, SU-WEN CHEN, PUI-CHING LEE,* SHOU-DONG LEE and JAW-CHING WU. Genotypes and Viremia of Hepatitis B and D Viruses Are Associated With Outcomes of Chronic Hepatitis D Patients. *GASTROENTEROLOGY*. 2006;130:1625-35.
70. Grazia Anna Niro DG, Rosanna Fontana. Hepatitis delta virus infection: Open issues. *Digestive and Liver Disease*. 2011;43S:S19-S24.
71. Ashish Goyal JMM. The Impact of Vaccination and Antiviral Therapy on Hepatitis B and Hepatitis D Epidemiology. *PLoS ONE* 9(10): e110143. 2014.
72. Zaigham Abbas MA. Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic options. *World J Gastroenterol* 2015;21(32):9461-5.
73. Oluyinka Oladele Opaleye OMJ, Olubusuyi Moses Adewumi, Ewean Chukwuma Omoruyi, Olusola Anuoluwapo Akanbi, Adeolu Sunday Oluremi, Bo Wang, Hoang van Tong, Thirumalaisamy P. Velavan and C. Thomas Bock Molecular epidemiology of hepatitis D virus circulating in Southwestern Nigeria. *Virology Journal*. 2016;13(61).
74. Gulshan Zaidi MI, Fayyaz Ahmed Malik, Irum Amin, Muhammad Shahid, Saima Younas, Rashid Hussain, Zunaira Awan, Aaliyah Tariq, Khalida Parveen. Prevalence of hepatitis delta virus infection among hepatitis b virus surface antigen positive patients circulating in the largest province of pakistan. *Virology Journal*. 2010;7(283).
75. Massimo De Paschale CC, Teresa Cerulli, Debora Cagnin, Serena Cavallari, Joseph Ndayake, Dieudonné Zaongo, Gianbattista Priuli, Paolo Vigano and Pierangelo Clerici. Prevalence of HBV, HDV, HCV, and HIV Infection During Pregnancy in Northern Benin. *Journal of Medical Virology*. 2014;86:1281-7.
76. Wael Mansour M-AB, Cheikh-Tijani Hamed, Ségolène Briclher, Frédéric Le Gal, Alexandra Ducancelle, Baidy Lô, Emmanuel Gordien, Michel Rosenheim, Françoise Lunel. Virological and epidemiological features of hepatitis delta infection among blood donors in Nouakchott, Mauritania. *Journal of Clinical Virology* 2012;55:12- 6.
77. A. Djebbi WKR, O. Bahri, N. Hogga, A. Sadraoui, H. Triki. Serological markers, viral RNA and genotype of hepatitis delta virus in HBs antigen positive Tunisian patients. *Pathologie Biologie*. 2009;57:518-23.
78. Kew AKaMC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology Research*. 2007;37(SUPPL. 1):S9-S19.
79. Patrizia Farci GAN. Clinical Features of Hepatitis D. *Semin Liver Dis*. 2012;32:228-36.

80. GRAZIA A. NIRO AS, ANGELO ANDRIULLI, MARIO RIZZETTO, JOHN L. GERIN AND JOHN L. CASEY. The Predominance of Hepatitis Delta Virus Genotype I Among Chronically Infected Italian Patients. *HEPATOLOGY* 1997;25(3):728-34.
81. Andernach IE LL, Tarnagda ZS, Tahita MC, Otegbayo JA, Forbi JC, Omilabu S, Gouandjika-Vasilache I, Komas NP, Mbah OP, Muller CP. Characterization of hepatitis delta virus in sub-Saharan Africa. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1629-36.
82. CHIEN-WEI SU YHH, TEH-IA HUO, HSUAN HUI SHIH, I-JANE SHEEN, SU-WEN CHEN, PUI-CHING LEE, SHOU-DONG LEE and JAW-CHING WU. Genotypes and Viremia of Hepatitis B and D Viruses Are Associated With Outcomes of Chronic Hepatitis D Patients. *GASTROENTEROLOGY* 2006;130(6):1625-35.

ANNEXE 1**FICHE D'ENQUETE****FICHE D'ENQUETE**

Date/ __/__/__ / Code/ _____ / Numéro d'identification / _____/

1- IDENTIFICATION

Date de naissance / __/__/__ / Sexe: Féminin/____/ Masculin /____/

Zone de provenance: Urbain /__/ Rural /__/

Nationalité / _____ / Ethnie / _____ / Région d'origine/ _____/

2- NIVEAU D'ETUDE

Université /__/ Lycée /__/ Collège /____/ Primaire /__/ Jamais fréquenté /____/

3- SITUATION MATRIMONIALE

Célibataire /__/ Mariée /__/ Divorcée/____/ Avez-vous des enfants? Oui /__/ Non /__/

Si Oui, combien?/____/ A quelle âge êtes-vous marié? /____/ ans

4- OCCUPATION ACTUELLE

Employé de bureau/____/ Etudiant (e) /____/ Menagère /____/ Sans Emploi/____/

Corps habillé/____/ Medical /____/ Religieux /____/

5- RENSEIGNEMENT CLINIQUE

Antécédant familiaux vis-à-vis de l'hépatite B ou C? Oui /____/ Non /____/

Si Oui, quelle a été votre rôle auprès du patient? / _____

Est-ce que c'est votre : Père /__/ Mère /____/ Sœurs/____/ Frères /____/ Proches /____/

Signe présenté par le malade? Fatigue /____/ Cirrhose /____/ Ictère /__/ Autres /__/

6- FACTEUR DE RISQUE

Vous avez été une fois transfusé ? Oui /____/ Non /____/

Vous avez été une fois subir une intervention chirurgicale ? Oui /____/ Non /____/

Avez-vous une fois pratiqué la toxicomanie ? Oui /____/ Non /____/

Êtes-vous Hétérosexuel /____/ Homosexuel /____/ Bisexuel /____/ ?

Signe de sclérisation ? Oui /____/ Non /____/

Avez-vous été excisée (Femme) ? Oui /____/ Non /____/

7- CONNAISSANCE DE LA SEROLOGIE HEPATITES/VIH

Sérologie VHB : Positif /__/ Négative /__/ Ne sais pas /__/ Année de diagnostic /__/

Sérologie VHC : Positif /__/ Négative /__/ Ne sais pas /__/ Année de diagnostic

/__/

Sérologie VHD : Positif /__/ Négative /__/ Ne sais pas /__/ Année de diagnostic

/__/

Sérologie VIH: Positif /__/ Négative /__/ Ne sais pas /__/ Année de diagnostic

/__/

Nom de l'enquêteur: _____ Signature: _____

RESULTATS DU DEPISTAGE

AgHBs: _____ *Ac Anti-VHC*: _____ *Ac Anti-VHD*: _____

Conclusion: _____

Nom de l'agent ayant réalisé ou validé le dépistage: _____

Date/ ____/____/_____/ Signature: _____

ANNEXE 2

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

TITRE DE LA RECHERCHE

Prévalence, facteurs de risques et épidémiologie moléculaire de l'hépatite virale delta au sud Togo.

INVESTIGATEURS

- Pr Jacques SIMPORE, Professeur Titulaire de Génétique et de Biologie moléculaires à l'Université de Ouagadougou ;
- Dr Emmanuel GORDIEN, Maitre de conférences des universités Praticien Hospitalier
- Frédéric LEGAL, Ingénieur en Chimie et PhD en Virologie
- Athenaïs GERBER, Ingénieur
- Folly ANYOVI, Doctorant en Virologie Moléculaire et étudiant en santé internationale

Tél : 00228 90 86 96 13 /00201007431807/ folly.anyovi@gmail.com

Monsieur Folly ANYOVI, doctorant en Virologie Moléculaire nous propose de participer à une étude dans le cadre du projet de recherche sur le diagnostic moléculaire et génétique de l'hépatite delta au Sud Togo.

1°) Nous acceptons cette démarche en connaissant les conditions de cette recherche décrites ci-dessous : L'objectif de cette étude est de caractériser les génotypes du VHD circulant au Togo. Elle s'intéresse aux personnes jeunes adultes vivant avec le VHD reçues en Conseil de Dépistage Volontaire et ceux du centre de l'ONG ASADH.

A partir du sang prélevé, des tests seront réalisés : la sérologie du VHB, VHC, VHD et la caractérisation du génotype. Une fiche individuelle d'enquête sera remplie et comprendra des renseignements d'identification (code CDV ou numéro du dossier de suivi et contacts tout en conservant l'anonymat), des renseignements cliniques (sujet symptomatique ou non), les antécédents (notion des maladies intercurrentes, état sérologique du conjoint, parité) et des données biologiques (sérologie VIH, VHB). Le sang sera prélevé sur 2 tubes de 5 ml chacun : 1 tubes avec anticoagulant et 1 tube sec.

Les avantages de cette étude sont entre autres :

- La présence ou l'absence des ARN et ADN chez le sujet infecté par le VHD/VHB/VHC guidera la décision de sa mise sous traitement et déterminé la durée du traitement ; ceci limitera un échappement viral ;
- La détermination des génotypes du VHD/VHB/VHC circulant au Togo ;
- Contribution à la recherche de la thérapie des hépatites virales

Les investigateurs liés à cette investigation sont essentiellement liés au prélèvement sanguin et sont donc négligeables eu égard aux avantages.

2°) Nous avons eu la possibilité de poser les questions qui nous paraissent utiles et d'en recevoir les réponses claires

3°) Nous acceptons librement et volontairement de participer à la recherche décrite ci-dessus. Nous sommes parfaitement conscients que nous pouvons retirer à tout moment notre participation à cette recherche et cela quelles que soient nos raisons et sans supporter aucune responsabilité.

Notre consentement ne décharge en rien l'investigateur de ses responsabilités morales et légales et nous conservons nos droits garantis par la loi.

Fait à Lomé, le / / 2015

Signatures

Participant

Chercheur

Code CDV.....

Folly ANYOVI (**Ph.D** candidat)