

HEPATITE B/DELTA EN CENTRAFRIQUE

1 – Responsables Scientifiques

1.1. Centrafrique

Dr Narcisse Patrice Komas
Laboratoire des Hépatites Virales
Institut Pasteur de Bangui
Avenue Indépendance
BP 923
Tél : + 236 70 93 05 73
Fax : + 236 21 61 01 09
Email : nkomas@pasteur.cf;
npkomas@yahoo.fr

1.2. France

Pr Paul Dény
Laboratoire de Bactériologie,
Virologie - Hygiène
Hôpital Avicenne
125 Rte de Stalingrad, 93009 Bobigny
Tél. : + 33 4 72 68 19 70
Fax : + 33 4 72 68 19 71
Email : paul.deny@inserm.fr

2 – Equipes participantes

2.1. Centrafrique

2.1.1. Institut Pasteur de Bangui

Pr Alain Le Faou
Dr Narcisse Patrice Komas,
Dr Claudine Békondi
Dr Alexandre Manirakiza

2.1.2. Cliniciens de Bangui

Pr Abdoulaye Sépou
Dr Jean Omer Ouavéné
Dr Jean Chrysostome Gody
Dr Valentin Fikouma

2.2. France

2.2.1. Laboratoire de Bactériologie, Virologie – Hygiène

Pr Paul Dény
Dr Emmanuel Gordien
Mariama Abdou

2.2.2. Unité INSERM U871

Pr Fabien Zoulim
Pr Christian Trépo
Dr Olivier Hantz
Dr Christian Pichoud
Dr Alan Kay
Pr Paul Dény

1 – Résumé du Projet

Objectifs : Réévaluer la prévalence des hépatites B (HB) et delta 25 ans après les premières épidémies B/delta décrites et identifier les génotypes HBV associés aux génotypes delta en République Centrafricaine (RCA). Les résultats préciseront l'étendue de ces 2 virus en RCA, différencieront les infections passées (sans répliation), des hépatites delta « actives », en vue d'un traitement et compareront les souches de 2009 aux souches ancestrales de 1984-1987.

Situation du sujet : En Afrique, le virus de l'hépatite delta (HDV) a une forte endémie chez les porteurs chroniques de l'AgHBs et présente une grande variabilité génétique. Récemment, la caractérisation d'un grand nombre d'isolats indique que le genre *Deltavirus* se compose d'au moins 8 clades majeurs (les 4 premiers sont cosmopolites et les 4 derniers exclusivement africains). L'infection par l'HDV survient en cas d'infection par le virus de l'hépatite B (HBV), utile pour l'assemblage de la particule virale et sa propagation. L'HDV induit un spectre large d'affections hépatiques allant de l'infection aiguë avec forme fulminante à l'infection chronique rapidement cirrhogène. L'infection aiguë par l'HDV peut survenir en même temps qu'une primo-infection HBV (co-infection) ou survenir chez un porteur chronique d'AgHBs (surinfection) où l'infection virale est d'entrée sévère ou fulminante et évolue souvent vers une infection persistante qui, cumulée à l'infection chronique HBV, aboutit plus rapidement à la cirrhose et au cancer du foie.

Problématique : Aucune étude n'a été entreprise sur l'évolution de l'HDV depuis l'épidémie d'hépatite fulminante des années 1980. La prévalence élevée d'HBV en Centrafrique (15%) constitue un terrain de choix pour propager le virus d'autant qu'aucune mesure préventive à l'échelle nationale n'est initiée. Cette étude vérifie le potentiel d'une transmission verticale de l'HBV-HDV et définit une cohorte de sujets jeunes, infectés par ces virus, susceptibles de bénéficier ultérieurement d'un traitement.

Méthodes : Dans un premier temps, des tests sérologiques (AgHBs, anticorps anti-HBc et anti-HDV) sur des «Dried Blood Spots» seront effectués par ELISA. Dix (10) ml de sang des patients AgHBs et/ou anti-HDV positifs seront prélevés dans des tubes secs pour des études de biologie moléculaire (amplification de l'ARN viral D et de l'ADN viral B, séquençage, génotypage et phylogénie) afin d'identifier les types en circulation en RCA. Les résultats seront comparés à ceux obtenus de façon reproductible à partir des échantillons de l'épidémie initiale de 1984-1987, conservées dans le laboratoire partenaire C.

Echéancier : Début de l'étude : dès obtention du financement (mars 2009). En France, extraction et caractérisation des échantillons anciens en prévenant les contaminations (Laboratoire A et C). En Afrique, durée de recueil des prélèvements contemporains (n = 3134) (équipe B et D) et tests sérologiques (Laboratoire B) en 2009 : 7 mois ; Etudes génotypique, sérotypage et analyse des régions spécifiques par PCR chez les patients infectés (Laboratoires A et B): 14 mois. Fin de l'étude et analyse finale des données : mars 2011.

Résultats attendus : La finalité de l'étude est i) d'obtenir des données précises sur l'évolution de l'HDV en RCA et d'identifier les souches de ce virus dans la population en la comparant aux souches ancestrales fulminantes des années 80; ii) de mettre en place la vaccination HBV, seule voie de prévention contre la transmission de l'hépatite virale delta et iii) d'étayer la mise en place possible d'un traitement individuel ou dans le cadre d'un protocole thérapeutique spécifique à préparer. La comparaison des caractéristiques génotypiques de l'HBV associé aux génotypes delta précisera la circulation des souches et pourra servir de bases de données pour des études médicales et scientifiques ultérieures.

2 – PROJET

2.1 – Objectifs du projet

2.1.1 – Objectif général

Evaluer la prévalence des hépatites B et delta 25 ans après les premières épidémies B/delta décrites et identifier les génotypes HBV qui sont le plus souvent associés aux génotypes delta rencontrés dans une population urbaine de Centrafrique afin de préciser l'étendue de l'infection de ces 2 virus dans ce pays.

2.1.2 – Objectifs spécifiques

Médicaux

- Déterminer en RCA, la prévalence des hépatites virales B et D et le réservoir potentiel de transmission de ces virus dans différentes catégories de la population centrafricaines (femmes enceintes, milieux universitaire et scolaire)
- Evaluer le potentiel de transmission verticale de l'hépatite B et D chez la femme enceinte afin de la prévenir
- Appuyer la politique vaccinale et de dépistage par des données actualisées
- Définir la nécessité de préparer un projet thérapeutique prospectif.

Scientifiques

- Caractériser le génotype des souches des virus des hépatites B et D isolés en Centrafrique
- Etablir et Analyser une carte d'association des génotypes HBV et HDV pour aborder l'hypothèse de pouvoirs pathogènes liés à des binômes B-delta particuliers.
- Comparer à 20-24 ans d'intervalle les séquences virales B/delta en référence des isolats responsables de l'épidémie survenue au milieu des années 80 pour préciser la virulence particulière de certaines souches.

3 – SITUATION INTERNATIONALE ET CONTEXTE EN CENTRAFRIQUE

Le virus de l'hépatite D (HDV) est un agent transmissible découvert il y a 32 ans (Rizzetto et al., 1977), mais existant probablement dans l'espèce humaine depuis très longtemps, comme en témoigne la grande variabilité génétique en particulier africaine (Radjef et al., 2004). Le génome de l'HDV est un ARN simple brin circulaire de 1672 à 1694 nucléotides de polarité négative (Wang et al., 1986). L'infection par le virus de l'hépatite D n'est possible qu'en cas d'infection par le virus de l'hépatite B (HBV) pour l'assemblage de la particule virale et sa propagation. En effet, le bourgeonnement de la particule HDV s'effectue au niveau du réticulum par enveloppement au sein de membranes portant les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B : la petite, la moyenne et la grande protéine de surface du virus de l'hépatite B portant l'antigène HBs (Ag HBs). Ce virus infecte probablement environ 5% des 360 millions d'individus infectés par HBV dans le monde, mais les données sont fragmentaires et restent encore inconnues dans de nombreuses régions.

HDV a été rattaché aux viroïdes, mais cette affiliation est discutée et il continue d'apparaître comme virus Non Classé. En effet, contrairement aux viroïdes qui ne codent pas de protéine, HDV a un cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame, ORF), sur sa molécule antigénomique intermédiaire de réplication dans le foie, qui exprime une protéine delta dont il existe deux isoformes (Taylor, 2003). Le virus de l'hépatite D induit un spectre large d'affections hépatiques allant de l'infection aiguë avec forme fulminante à l'infection chronique rapidement cirrhogène. L'infection aiguë par l'HDV peut survenir en même temps qu'une primo infection aiguë par le virus de l'hépatite B (on parle alors de co-infection) ; une hépatite aiguë parfois bénigne, susceptible cependant d'être sévère voire fulminante est alors possible ; dans ce cas, le risque de persistance chronique des deux virus est faible. Une infection par l'HDV peut survenir chez un porteur chronique d'antigène HBs (Ag-HBs) (on parle alors de surinfection) où l'infection virale est d'entrée sévère ou fulminante

(pouvant justifier une transplantation hépatique) et évolue souvent vers une infection persistante qui cumulée à l'infection chronique par l'HBV aboutit plus rapidement à la cirrhose et au cancer du foie (carcinome hépatocellulaire) (Casey, 1996 ; Rizzetto and Durazzo, 1991, Romeo,2009). Outre l'accélération des processus de fibrose, le rôle potentiel des protéines du virus de l'hépatite delta dans la cancérogenèse est évoqué (Williams et al 2003).

Les études épidémiologiques ont montré que l'HDV a parfois une forte endémie chez les porteurs chroniques de l'Ag HBs (Cronberg, 1984 ; Greenfield, 1986 ; Goudsmit, 1984 ; Crovari et al., 1991). Ainsi, ce virus est endémique dans le bassin Méditerranéen, le Moyen Orient, **l'Afrique Centrale** et la partie nord de l'Amérique du Sud. En revanche, sa prévalence dans les pays industrialisés reste faible et sa transmission dans ce cas est souvent associée à l'usage des drogues intraveineuses. L'ouverture des pays de l'Est de l'Europe s'accompagne également de la transmission du virus chez des usagers de drogues par voie intraveineuse. La transmission intrafamiliale, présente en Amazonie et en Afrique subsaharienne, a également été décrite dans les pays du Bassin Méditerranéen. Dans tous les cas, la voie de transmission la plus souvent décrite est parentérale (sanguine ou sexuelle). Peu de données étayaient la possibilité de transmission materno-néonatale qui est considérée comme rare.

Classiquement, seulement trois génotypes d'HDV avaient été caractérisés jusqu'en 2003 sur la base d'un petit nombre de génomes complètement séquencés (Casey et al., 1993 ; Imazeki et al., 1991 ; Wang et al., 1986 ; Wu et al., 1998). Récemment, la caractérisation d'un grand nombre de séquences du virus de l'hépatite delta chez des patients d'origine africaine, vivant en France, a redéfini la variabilité génétique de l'HDV en caractérisant différents clades hautement divergents. Ainsi, actuellement, le genre Deltavirus semble composé d'au moins 8 clades majeurs (Radjef et al., 2004,; Le Gal et al., 2006). Le génotype I ou clade I (HDV-1), ubiquitaire, est retrouvé en Europe, Amérique du Nord, Afrique, et certaines souches ont été isolées au Moyen Orient, en Asie et dans des îles du pacifique (Nauru) ; le génotype II ou clade II (HDV-2) est présent au Japon, à Taiwan et en Yakoutie (Russie) ; le génotype III ou clade 3 (HDV-3) a été exclusivement trouvé en Amérique du Sud associé au génotype F de l'HBV. Le quatrième clade, considéré initialement comme un variant du clade 2 est présent bien individualisé en Asie (Wu et al., 1998 ; Watanabé, 2006, Dény 2006). **Les 4 derniers Clades sont Africains, en particulier dans la localisation Subsaharienne du continent**, le clade 5 ayant une localisation plutôt en Afrique de l'Ouest (Sénégal, Mali, Guinée, Côte d'Ivoire). Le clade 6 a été retrouvé plus ponctuellement à partir d'échantillons de patients originaires de Côte d'Ivoire, du Cameroun et d'Angola, le clade 7 semble concentré au Cameroun, au Tchad et en République Démocratique du Congo. Enfin, actuellement au laboratoire de Bobigny seuls quelques isolats de l'HDV-8 de patients originaires de Côte d'Ivoire, de la République du Congo et de la République Démocratique du Congo sont caractérisés (Le Gal et al., 2006). Un virus de ce clade a été caractérisé au Gabon chez une femme enceinte (Makuwa et al., 2008). Il importe donc de préciser *in situ*, en Afrique, la réalité de ces infections delta qui restent méconnues et dont l'étude du pouvoir pathogène est fragmentaire en particulier au cours de certaines épidémies au profil histologique très particulier attribuées à l'HDV (*cf infra*); une de ces épidémies est survenue dans les années quatre-vingts en République Centrafricaine (Lesbordes et al.,1987).

En effet, la gravité de l'infection B delta découle de l'existence possible d'associations évolutives et/ou géographiques particulières de certains « binômes HBV - HDV » (par exemple HBV/D et HDV-1 en Méditerranée (Saudi et al., 2003), HBV/F et HDV-3 en Amazonie (Casey et al., 1996)...). Certains binômes HBV – HDV seraient probablement plus pathogènes que d'autres. Ainsi, il est admis que l'association HDV-3 - HBV/F soit responsable d'un pouvoir pathogène importante dans les populations autochtones sud-américaines. Il est également suggéré à Taiwan que certains isolats HDV du clade 2 soient moins pathogènes que des isolats HDV du clade 1 (Wu et al., 1995). Cependant, a contrario, certains isolats HDV du clade 1 sont, sur l'île de Rhodes (Grèce) associés à une infection très peu agressive (Hadziyannis et al., 1991) Par ailleurs, au sein des virus de clade 4

asiatique, bien qu'il n'y ait pas de différences significatives de l'environnement HBV, des patients infectés avec un sous-type HDV « M » (pour l'île de Miyako) auraient de façon significative une progression plus importante vers l'hépatite chronique et vers la cirrhose en comparaison des patients infectés par un autre sous-type du même clade (Watanabe et al., 2003). Il n'est pas impossible que la «transplantation» d'un virus delta dans un environnement HBV d'un autre génotype que celui habituellement associé puisse modifier le pouvoir pathogène. Au sein des hypothèses susceptibles d'expliquer le pouvoir pathogène de l'HDV, l'efficacité de l'édition (Casey JL 2006) et le rôle de la prénylation de la grande protéine (O'Malley & Lazinski, 2005) sont également suggérés. Cependant les modèles se limitent à 2 ou 3 génotypes et n'explorent pas la totalité de la variabilité génétique de l'HDV, en particulier africaine. De plus, ces travaux se limitent le plus souvent à un seul type d'HBV auxiliaire. De façon très claire, au cours des transplantations hépatiques pour une infection B - delta chez l'homme, la gravité de l'atteinte hépatique du greffon est liée à la présence de l'HBV ; la détection isolée de marqueurs delta dans le foie ne s'accompagne pas de lésions hépatiques significatives ; en revanche, la récurrence de l'infection HBV conduit à une augmentation massive de l'expression de l'AgHD dans le foie, associée au développement d'une hépatite lobulaire (David et al., 1993; Davies et al., 1992; Zignego et al., 1993).

En 1987, une épidémie d'hépatite Delta s'est déclarée en Centrafrique. Une série de 124 hépatites fulminantes sur 154 cas d'ictères graves a été répertoriée parmi les patients hospitalisés au Centre National Hospitalier Universitaire de Bangui (CNHUB). Près de 88% des patients sont décédés (Lesbordes et al., 1986, 1987a ; 1987b). De façon caractéristique, certaines lésions histologiques retrouvées au cours de ces hépatites fulminantes (65% des cas) mettaient en évidence une hépatite spongiocytaire associant des lésions de nécrose hépatocytaire éosinophile, une stéatose massive macro ou microvacuolaire donnant aux cellules un aspect particulier de type « morulla cell » et des infiltrats lympho-plasmocytaires. De telles lésions ont été décrites au cours d'épidémie d'hépatite fulminante en Amérique du Sud associées au binôme HBV-F/HDV-3. En République Centrafricaine (RCA), un virus, susceptible de posséder une mutation du codon de terminaison de la petite protéine a été décrit de façon ponctuelle, cependant le reste de la séquence nucléotidique de cet isolat est similaire au prototype HDV-1. Dans l'expérience du laboratoire de Bobigny, les isolats de patients originaires de RCA sont principalement de clade 1 mais possèdent peut-être des signatures spécifiques de l'HDV-1 africain (Le Gal, 2007). Ainsi dans la portion carboxy-terminale de la grande protéine delta il existe une mutation ponctuelle entre les isolats « ubiquitaires » et les isolats « africains » au sein du génotype I. Il apparaît donc nécessaire de pouvoir faire une étude étendue de la prévalence de l'hépatite Delta et des variations du génome de l'HDV au sein de la population de République Centrafricaine où le taux d'infection par l'HBV est estimé à 15% de la population avec un taux d'infection delta susceptible de représenter un quart des patients.

De plus, il sera possible de comparer les souches virales obtenues en 2009 aux souches prototypes colligées depuis 1984 à l'Unité Inserm 271 de Lyon. En effet, les sérums de patients décédés d'hépatite fulminante à Bangui ont été colligés et conservés depuis cette époque dans l'unité. Les structures compactes des capsides HBV (ADN circulaire encapsidé) et des ribonucléoprotéines HDV (ARN pseudo double brin associé aux protéines delta) rend possible de détecter par les techniques d'amplification géniques les séquences ancestrales liées aux hépatites fulminantes et de les comparer aux souches actuelles. Ce dernier point renforce l'originalité de la partie scientifique du travail.

Références :

- Casey JL.** 1996. Hepatitis delta virus. Genetics and pathogenesis. *Clin. Lab. Med.* **16**:451-464
- Casey JL,** Curr Top Microbiol Immunol 307, 67 (2006).
- Casey JL, Brown TB, Wignall FS, and Gerin JL.** 1993. A genotype of hepatitis delta virus that occurs in northern South America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9016-9020
- Casey JL et al.,** J Infect Dis 174, 920 (1996).
- Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, Gomez H, McCarthy M, Watts DM, Hyams KC, Gerin JL.** 1996. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of

- acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis.* **174(5)**:920-6
- Cronberg S, Hansson BG, Thermos M, Moestrup T, Sow AM.** 1984. Hepatitis D (delta agent) in primary hepatocellular carcinoma and liver disease in Senegal. *Liver* **4**:275-279
- Crovati P, Santolini M, Bandettini R, Bonanni P, Branca P and Coppola RC.** 1991. Epidemiology of HBV and HDV infections in a rural area of Central African Republic. In *The Hepatitis Delta Virus and Its Infection*, Rizzetto M, Gerin JL, Purcell RH eds., A Liss Inc., New York: 69-73
- David E** et al., *Gastroenterology* 104, 1122 (1993).
- Deny P.** 2006. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? *Curr Top Microbiol Immunol.* **307**:151-71
- Goudsmith J, Van der Waals F, Ponzetto A, Forzani B, Dobbelaar C.** 1984. Infections with the hepatitis B virus associated delta agent in an isolated West African Community. *J. Trop. Med. Hyg.* **87**:257-262
- Greenfield C, Farci P, Osidiana V, MacPherson CNL, Romig T, Zeyhle E, French M, Johnson B, Tukei P, Wankya BM and Thomas HC.** 1986. Hepatitis Delta virus infection. Its geographic and tribal distribution. *Am. J. Epidem.* **123**:416-423
- Imazeki F, Omata M, and Ohto M.** 1991. Complete nucleotide sequence of hepatitis delta virus RNA in Japan. *Nucleic Acids Res.* **19**:5439-5440
- O'Malley B, D. W. Lazinski,** *J Virol* 79, 1142 (2005).
- Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, Dény P.** 2006. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis.* **12 (9)**:1447-50
- Le Gal F.** 2007. Diversité génétique du virus de l'hépatite delta (HDV) en Europe et en Afrique : caractérisation et implication en virologie médicale Thèse de Diplôme de doctorat université Paris 13,
- Le Gal F., Castelneau C, Gault E., Al Hawajri N., Gordien E, Marcellin P., Dény P.** 2007. Hepatitis D Virus Infection – not a vanishing disease in Europe!, answer. *Hepatology* 2007
- Lesbordes JL, Georges AJ, Ravisse P, Beuzit Y, Enamira D, Meunier D, Gonzalez JP, Georges M, Chevallier P, Pichou C, Trépo C, Rimiara JP.** 1986. Virus de l'hépatite delta (VHD) et hépatites fulminantes en république Centrafricaine (à propos de 92 observations). *Médecine et Armées*, 14, 545-551
- Lesbordes JL, Ravisse P, Georges AJ, Beuzit Y, Ave P, Enamra D, Meunier DMY, Goerges MC, Gonzalez JP, Chevalier Ph, Pichou C and Trepo Ch.** 1987a. Le rôle du virus delta dans les hépatites fulminantes en Afrique Centrale. *Ann. Med. Interne* **138**:199-201
- Lesbordes JL, Ravisse P, Georges AJ, Chevallier P, Pichou C, Vitvitski L, Trépo C.** 1987b. studies on the role of HDV in an outbreak of fulminant hepatitis in Bangui (Central African Republic). In *The Hepatitis Delta Virus and Its Infection*, Rizzetto M, Gerin JL, Purcell RH eds., A Liss Inc., New York: 451-459
- Makuwa M, Caron M, Souquière S, Malonga-Mouelet G, Mahé A, Kazanji M.** 2008 Prevalence and genetic diversity of hepatitis B and delta viruses in pregnant women in Gabon: molecular evidence that hepatitis delta virus clade 8 originates from and is endemic in central Africa. *J Clin Microbiol.* ;46(2):754-6. .
- Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anais P, Drugan T, Trinchet JC, Roulot D, Tamby M, Milinkovitch MC, Deny P.** 2004. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *J. Virol.* **78(5)**:2537-44
- Rizzetto M, Canese M and Arico S.** 1977. Immunofluorescence detection of a new antigen antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBs Ag carriers. *Gut* **18**:997-1003
- Rizzetto M, and Durazzo M.** 1991. Hepatitis delta virus (HDV) infections. Epidemiological and clinical heterogeneity. *J. Hepatol.* **13**:S116-S118
- Saudy N. et al., *J Med Virol* 70, 529 (2003).
- Sureau C, Guerra B, and Lanford RE.** 1993. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J. Virol.* **67**:366-372
- Taylor JM.** 2003. Replication of human hepatitis delta virus: recent developments. *Trends Microbiol.* **11**:185-190

Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM, Mullenbach GT, Denniston JL, Gerin JL, and Houghton M. 1986. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (d) viral genome. *Nature* **323**:508-514 (Erratum, **328**:456, 1987)
Watanabe H et al., *J Gen Virol* **84**, 3275 (2003).
Wu JC et al., *Lancet* **346**, 939 (1995).
Zignego AL, D. Samuel, P. Gentilini, H. Bismuth, *Arch Virol Suppl* **8**, 281 (1993).

4 – ACTIVITE ANTERIEURE DES EQUIPES DANS LE DOMAINE

4.1 – Activité antérieure de l’Institut Pasteur de Bangui (IPB) dans le domaine

Outre la participation de l’IPB dans la collection d’échantillons au cours de l’épidémie des années 80 et l’envoi à l’Inserm U271 (Lyon, Directeur à l’époque Pr C Trépo), une étude préliminaire effectuée en début de l’année 2007 sur 168 sérums AgHBs positifs confirmés de la sérothèque de l’IPB a permis de mettre en évidence 45 (26,8%) cas positifs en anticorps anti-HDV confirmant l’importance actuelle de l’infection delta en République Centrafricaine ! De façon plus approfondie, les études suivantes ont été réalisées

4.1.1. Prévalence des hépatites B et delta au sein de la population infantile de Bangui

En 2005 une étude a été menée à l’IPB sur les hépatites virales B en milieu pédiatrique. Cette étude a porté sur 525 enfants, âgés de 0 à 15 ans, venus consulter au Complexe Pédiatrique de Bangui pour des cas de paludisme. Quatre spots de deux gouttes de sang ont été prélevés et séchés sur du papier Whatmann (Dried Blood Spots). Des tests ELISA ont été réalisés sur ces spots afin de déterminer l’AgHBs, l’anticorps anti-HBc, l’anticorps anti-HBs et l’anticorps anti-HDV.

Tableau I : Prévalence des marqueurs des hépatites virales B et D parmi les enfants de 0 à 15 ans

Marqueurs	Nombre de cas positifs	Nombre de cas Négatifs	Total
AgHBs	44 (8,4%)	481 (91,6%)	525
Anticorps antiHBc totaux	84 (16%)	441 (84%)	525
Anticorps anti-HDV sur les 44 AgHBs positifs	1 (2%)	-	-

Cette étude indique que l’infection par l’hépatite B existe de manière précoce chez les jeunes enfants. Le taux d’infection par le HBV est très élevé chez les enfants de 10 à 15 : 48% des enfants de cette tranche d’âge présentent au moins un des deux marqueurs AgHBs et/ou Anticorps anti-HBc. Ces données suggèrent une contamination intrafamiliale et également dans certains cas sexuelle.

Alors que l’infection par le HBV est précoce, celle par le HDV apparaît plus tardivement. Le seul cas d’hépatite virale D suggère que la co-infection est rare dans cette tranche d’âge, dans la population étudiée, ce qui incite à faire une étude sur une population de tranche d’âge supérieure.

4.1.2. Etude des facteurs de risques de transmission des hépatites B et delta en milieux scolaire et universitaire de Bangui

Pour identifier les principaux facteurs de risque de transmission de l’hépatite virale B en milieu scolaire et universitaire, une enquête a été réalisée, du 1^{er} au 28 février 2007, au sein des établissements scolaires et universitaires de Bangui sur 801 élèves et étudiants (575 élèves pour 226 étudiants prélevés).

Tableau II : prévalence des marqueurs des hépatites B et delta en milieux scolaire et universitaire

MARQUEURS	Nombre de cas positif dans les Lycées n = 575 (%)	Nombre de cas positif à l'Université n = 226 (%)	TOTAL n = 801 (%)
AgHBs	79 (13,73)	45 (19,9)	124 (15,5)
Ac Anti HBc	256 (44,52)	73 (32,3)	329 (41,1)
Ag Delta sur les AgHBs positifs	0	0	0
Ac Anti Delta sur les AgHBs positifs	2 (2,53)	3 (6,67)	5 (4,03)

Cette étude montre que la prévalence de l'hépatite B est très élevée dans la population scolaire et universitaire à Bangui. La prévalence de 4% de HDV obtenue sur les sujets AgHBs positifs situe cette population dans la tranche des zones à prévalence élevée. Etant donné que les sujets infectés par le virus de l'hépatite delta sont nés soit juste avant l'épidémie d'hépatite delta de 1987, c'est-à-dire entre 1982 et 1986 pour les 3 étudiants soit après cette épidémie pour les élèves, il serait intéressant de comparer les souches responsables de l'épidémie aux souches responsables de l'infection des élèves et étudiants de cette enquête.

4.2 – Expériences du Laboratoire de Virologie d'Avicenne de Bobigny dans le domaine

Les prélèvements reçus à Avicenne dans le Laboratoire associé au Centre National de référence des hépatites B, C et delta concernent des patients suivis en France. L'analyse des données du laboratoire depuis l'année 2000 indique une modification profonde de l'origine des patients suivis en France. Les patients originaires de l'Europe de l'Ouest, qui représentaient environ 50% du recrutement en 2001 représentent en 2006 environ 17% des échantillons reçus. Les prélèvements de patients originaires de l'Europe de l'Est sont passés de 10% à 20% pendant la même période. Mais le fait le plus marquant est l'augmentation très significative de la proportion de patients infectés par le virus de l'hépatite delta originaires d'Afrique. Ainsi, la prévalence en 2006 a atteint 70% des échantillons reçus (Le Gal et al., 2007).

Le laboratoire de Bobigny, Laboratoire associé au Centre de Référence National des hépatites B, C et delta est à l'origine de la définition internationale du genre delta virus composé de 8 clades majeurs : (Ivaniushina et al., 2001, Radjef et al., 2004 ; Le Gal et al., 2006 ; Dény et al., 2006). Il maîtrise les amplifications de gènes qualitative et quantitative, séquençage et analyses phylogénétiques susceptibles de reconnaître ces différents virus.

Il a développé en lien avec le groupe « HBV-HIV résistance de l'ANRS » différents outils de caractérisation des génotypes HBV, des variants de la région Pré-C-C et des mutations de résistance aux analogues de nucléos(t)ides.

4.3 – Expérience de l'U871 (ex U271) de Lyon dans ce domaine

L'Unité 871 (Directeur Fabien Zoulim) a pour projet : « Physiopathologie moléculaire et nouveaux traitements des hépatites virales ». Au sein de cette unité sont conservés les échantillons (38 boîtes de cryo-congélation) des études antérieures (décrites dans le chapitre « situation du sujet ») menées dans les années 84 à 87 au sein de l'U271 (C Trépo) en collaboration avec l'IP Bangui et le Dr JL Lesbordes. Y sont également conservés certains échantillons de marmottes infectées expérimentalement à l'époque par des pools de sérums en provenance de Bangui. Sont disponibles certains échantillons de patients décédés d'hépatite fulminante ou prélevés en phase d'hépatite chronique. Sont également disponibles des échantillons des membres de 10 familles au sein desquelles est survenue une hépatite fulminante. Il y a également des sérums témoins de l'époque (personnel infirmier). Bien que le délai de conservation soit relativement long (21-23 ans) et que certains sérums aient été épuisés, la richesse de la collection et la résistance des acides nucléiques (en particulier viraux encapsidés) permet d'envisager l'utilisation de l'amplification de gènes dans des conditions draconiennes de prévention des contaminations et de purification importante compte tenu de la qualité fortement « ictérique » de certains échantillons. En

revanche, il paraît illusoire de s'ingénier à quantifier les acides nucléiques de ces échantillons. Les techniques d'extraction d'ADN/ARN, les amplifications, les clonages et les cultures cellulaires spécialisées dans la production et l'isolement des virus hépatotropes, sauvages et mutants sont disponibles au laboratoire. Ce dernier dispose également de structures L2 pour la bactériologie et L2 et L3 pour la virologie.

5. HYPOTHESES DE TRAVAIL

5.1. – Hypothèses et questions posées

Depuis les derniers cas décrits d'épidémie fulminante d'hépatite delta vers la fin des années 1980, aucune autre étude n'a été initiée pour évaluer l'évolution de la contamination dans la population de la RCA.

En 2002, une étude séroépidémiologique menée chez 544 femmes enceintes à Bangui (15 – 45 ans) a montré que près de 74,8% de la population féminine en âge de procréer avait été infectée au préalable par le virus de l'hépatite B. L'antigène HBs a été mis en évidence chez 66 d'entre-elles (12,1%). Parmi les porteurs de l'antigène HBs, 7,6% étaient porteuses de l'HBe.

La République Centrafricaine est située dans une zone de forte endémicité d'hépatite virale B ; compte tenu des épidémies Delta des années 80, on s'attend à avoir un taux élevé de contamination par l'hépatite delta chez les patients né avant ou pendant cette période. Rappelons que lors de cette épidémie, pour 154 hépatites sévères nécessitant l'hospitalisation, 124 décès étaient survenus mais aucune donnée sur la population générale n'était disponible à l'époque. Des anticorps anti-delta ont été décelé dans les échantillons de certains membres des familles (Lesbordes et al.,1986). La détermination préliminaire en 2007 d'un taux de 26% d'infection delta chez le sujets Ag HBs positifs, justifie particulièrement la caractérisation moléculaire de ces infections (fréquence et niveau de réplication virale, associations de co-infection virale B et delta, comparaison des souches responsables d'hépatite chronique avec les souches associées aux hépatites fulminante...). Plusieurs hypothèses et questionnements pourront alors être soulevés :

- 1 – Si une prévalence élevée persiste chez des patients nés après l'épidémie, quel est le mode principal de transmission du virus delta qui persiste ? Comment accentuer la prévention ?
- 2 - Si la prévalence est élevée pour les tranches d'âge considérées (plus d'un patient sur 5) comment initier un protocole thérapeutique à large échelle pour tenter de limiter l'évolution vers le carcinome hépatocellulaire de sujets jeunes.
- 3 – Y a t'il dans le contexte particulier de l'accouchement une transmission possible de la mère à l'enfant du VHB dans le cadre de l'infection B et delta. Le virus delta est-il susceptible de se transmettre également ?
- 4 - Pouvons nous dès à présent au cours de cette étude prévenir cette transmission par la vaccination contre l'HBV qui reste la meilleure façon de prévenir l'infection delta.
- 5 - Peut on « simplement » expliquer l'hypothèse d'une souche virale spécifique des hépatites fulminantes associées à une forme histologique particulière d'hépatite spongiocytaire ?
- 6 - Quels sont les binômes B-delta circulants en 1984-1987 et en 2009-2010 et quelle est l'évolution actuelle ?

5.2. Stratégie d'étude

Ne pouvant conduire l'enquête de prévalence de HBV et HDV sur tout le territoire Centrafricain compte tenu de la situation sociopolitique instable, du manque de sécurité sur les routes et à l'intérieur du pays et de l'absence de consultation en hépatologie et en gastro-entérologie dans les hôpitaux des villes de province, nous avons opté dans ce projet pour un échantillonnage en nous focalisant dans ce premier volet sur la ville de Bangui, (lieu de centralisation des hépatites fulminantes en 1984-87), de façon à maîtriser des données fiables. Pour étayer la prévention possible des dommages hépatiques grâce aux thérapies à

présent disponibles il nous semble important de se centrer sur des populations jeunes qui pourraient le cas échéant bénéficier de cette dernière. Ainsi, nous nous centrerons sur des élèves de Lycée de la classe de seconde en terminale, des étudiants de l'Université de Bangui et des femmes enceintes dans leur troisième trimestre de grossesse et des bébés de 0 à 6 mois. L'information aux sujets sera établie par campagne audiovisuelle, de presse et voie d'affichage.

6. EXPOSE DU PROGRAMME

6.1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude transversale qui sera réalisée sur 3 catégories d'individus de la population de Bangui, capitale de la République centrafricaine : élèves et étudiants, femmes enceintes et enfants nés des femmes enceintes dépistées AgHBs et/ou anticorps anti-HDV positives.

Elle aura pour but de éterminer les cas d'hépatite D chez des porteurs chroniques d'AgHBs et de différencier des infections anciennes probablement sans réplication virale delta et des hépatites delta encore actives pour préciser l'éventualité d'un traitement.

Les femmes enceintes dépistées au cours de leur troisième trimestre de grossesse seront suivies et les bébés seront vaccinés. Les nouveau-nés et les bébés de 0 à 6 mois seront prélevés pour la recherche d'AgHBs et ensuite d'anticorps anti-HDV. L'ARN viral delta sera recherché quand la séropositivité aura été confirmée.

6.2. Organisation de la recherche

Le travail sera divisé en 3 temps :

6.2.1. Le recrutement

Il se fera au niveau de Bangui (capitale de la République Centrafricaine) où se trouvent les trois principaux hôpitaux du pays, les Centres de Santé dotés de services de santé maternelle et infantile (SMI), les grands établissements scolaires publics et privés, la seule Université du pays et l'Institut Pasteur de Bangui. Cette centralisation facilitera le travail à cause de l'insécurité qui règne sur les routes à l'intérieur ainsi que les villes de province qui sont en plus dépourvues de service de gastroentérologie.

6.2.2. Dépistage de l'AgHBs et de l'anticorps anti-HDV

Dès que les prélèvements seront faits, ils seront acheminés à l'Institut Pasteur de Bangui où les tests ELISA seront réalisés pour détecter l'AgHBs et ensuite l'anticorps anti-HDV ainsi que l'AgHDV. L'IgM Anti-HDV, les anticorps anti-HBc et anti-HBe seront également recherchés.

6.2.3. Envoi des sérums positifs en France

Les sérums dépistés HDV positifs en 2008 – 2009 seront envoyés à l'équipe A (Hôpital Avicenne, Université Paris 13) pour l'identification des souches, la phylogénie et la charge virale.

Un technicien de l'Institut Pasteur de Bangui viendra en position de stage sur les sites en France dans le cadre de transfert de technologie. Schématiquement, il est prévu d'être à même de transférer sur l'IP Bangui :

- Les techniques d'extraction d'acides nucléiques selon des méthodes robustes et facilement exportables ne nécessitant qu'un minimum d'équipement (PSM et pompe à vide, microcentrifugeuse de paillasse).

- Les techniques d'amplification géniques pour analyse qualitative (génotypage des souches). Pour le virus de l'hépatite delta, une recherche qualitative sera systématiquement effectuée (Amplification de la région R0 selon le protocole décrit dans Ivaniushina et coll (2001). Pour le virus de l'hépatite B, une hemi-nested PCR dans la région PrÉS1 sera effectuée.

Seront également abordés au cours du stage :

- Les séquences nucléotidiques des échantillons anti-HDV positifs seront déterminées sur le site d'Avicenne avec l'aide du séquenceur 4 capillaires ABI -APPELLRA présent sur site. Un budget de fonctionnement est demandé pour cette activité.
- L'approche par PCR quantitative se fera, pour l'HDV grâce à la technique mise au point au laboratoire d'Avicenne (Le Gal et al., 2005). Pour l'HBV, le laboratoire dispose à présent de la chaîne de PCR quantitative Cobas TaqMan® HBV Roche.

Pour le transfert de ces technologies en RCA, il sera nécessaire de bénéficier d'un budget équipement très important et d'une pièce climatisée (ce qui dépasse le cadre de cet appel d'offres).

Au terme de l'identification des souches, un travail d'analyse phylogénétique sera réalisé dans le sens de déterminer les génotypes HBV associés au génotype delta et également essayer de déterminer à travers les sérums la répartition géographique des variants en se basant sur l'origine des participants à l'étude. De plus, des modèles de maximum de vraisemblance et d'analyse bayésienne seront menées pour tenter de préciser l'historique évolutif des souches et de l'épidémie.

6.3. Conditions d'obtention des différents matériaux biologiques en RCA

Une équipe d'enquêteurs se rendra sur les sites répertoriés et discutera des modalités pratiques de l'enquête avec les chefs d'établissement secondaires et des facultés de l'université de Bangui. Les enquêteurs organiseront des séances d'information dans chaque établissement scolaire visité et procéderont à la distribution de la notice d'information. Le formulaire de consentement sera remis à ceux qui accepteront librement de participer à l'étude. Les mineurs devront avoir l'autorisation parentale avant d'être recruté pour les tests de dépistage. Les étudiants et élèves qui seront dépistés recevront un counselling post-test par le service social de l'Institut Pasteur de Bangui.

Au niveau des formations sanitaires de Bégoua, Boy Rabe, Castors, Communautaire et Ouango, les médecins responsables du programme de transmission du VIH parent enfant (PTPE) sont responsables des prélèvements. Les femmes enceintes venues en consultations prénatales seront prélevées après un counselling pré-test fait par l'assistance sociale suivi du recueillement de consentement éclairé du sujet et des réponses au questionnaire de l'enquête. Le counselling post-test sera fait au niveau de chaque formation sanitaire lors de la remise des résultats à la patiente. Le suivi médical des femmes testées positives à l'hépatite virale B chronique se fera dans le cadre du programme de transmission parent / enfant (Pr Sépou) financé par le fonds mondial.

Le prélèvement des bébés se fera au Complexe Pédiatrique de Bangui (CPB) après consentement éclairé des parents. Il y aura dans le cas des bébés, un counselling pré- et post-test des parents par l'assistante sociale du Complexe Pédiatrique. Le suivi médical et la vaccination des bébés de 0 à 6 mois participant à cette étude se feront également au niveau du CPB par l'équipe médicale de cette institution (Dr Gody) impliquée dans le programme PTPE.

Les enquêteurs s'engagent à strictement respecter l'anonymat des personnes et la confidentialité des informations, c'est-à-dire que le nom des participants sera remplacé par un numéro, tout au long de l'étude et lors de la communication des résultats. Les résultats seront transmis au Médecin traitant des participants sous plis scellés.

Le bénéfice lié à cette étude sera la vaccination contre l'hépatite virale B pour tous ceux (adultes et enfants) qui seront dépistés négatifs. En outre, les frais de prélèvements et les analyses de laboratoire seront pris en charge par l'étude. Pour la mise en place d'un suivi médical des sujets AgHBs positifs, le taux des transaminases sera déterminé ainsi que la recherche de l'ARN du virus de l'hépatite D et de l'ADN viral circulant chez les porteurs chroniques de l'hépatite B seront réalisées. Des prélèvements annuels seront effectués pour les examens de sérologie, de biochimie et de charge virale afin de contrôler les cas possibles de réactivation virale et l'évolution de l'infection pour la mise en place d'un traitement au service de Médecine Interne de l'Hôpital de l'Amitié (Dr Ouavéné) et au Centre de Traitement Ambulatoire de la Croix Rouge Française à Bangui (Dr Fikouma). Enfin, les résultats des examens biologiques sont rendus sans délai aux participants par l'intermédiaire des assistantes sociales.

6.3.1. Modalités de suivi clinique et biologique des patients

En attendant la mise en place d'une politique nationale pour le suivi biologique et thérapeutique des personnes infectées par ces virus, le suivi biologique et médical, dans le cadre de cette étude, se fera tous les 3 mois pour les sujets en phase chronique présentant un AgHBs positif, un AgHBe positif, une charge virale détectable et/ou des transaminases élevées. Dans les autres cas, les visites médicales se feront une fois l'an. En pratique :

a) Patients porteurs de l'antigène HBs mais non infectés par le VIH.

Pour le VHB, actuellement, les recommandations européennes (EASL Clinical Practice Guidelines : Management of chronic hepatitis B, 2009 J Hepatol, in press) indiquent que les indications thérapeutiques reposent sur 1 - les niveaux de l'ADN viral HBV, 2 - les niveaux de transaminases, et 3 - les stades histologiques. Notre étude va déjà permettre d'apprécier les deux premiers critères. Il convient de considérer que la très grande majorité des patients dépistés AgHBs positifs de notre étude (voire la totalité) sont jeunes et probablement asymptomatiques (étudiants, lycéens, femmes enceintes). Dans les EASL Guidelines 2009, il est précisé p6 que les patients immunotolérants (<30 ans) avec un taux normal de transaminases et un ADN viral élevé, ($\geq 10^7$ UI/ml) sans suspicion de maladie du foie ne nécessitent pas de biopsie immédiate ni de thérapie. En revanche le suivi médical est indispensable. C'est le sens de notre projet, c'est à dire d'introduire un suivi médical chez les patients dépistés AgHBs positifs.

Si la charge virale est détectable et/ou les transaminases élevées, le suivi clinique et biologique se fera tous les trois mois. En présence de manifestations cliniques traduisant une évolution de l'atteinte hépatique le malade sera hospitalisé ou suivi en externe à intervalle plus rapproché. La persistance de l'antigène HBs et de l'AgHBe ou d'une charge virale élevée (>2000 UI/ml) pendant plus de 6 mois contribuera à identifier les patients susceptibles de bénéficier d'un traitement. Les recommandations actuelles en Europe vont dans le sens des antiviraux efficaces : soit le ténofovir, soit l'entécavir. L'interféron alpha paraît problématique dans son utilisation en CFA pour de nombreuses raisons en particulier en raison des complications iatrogènes et du mode d'administration.

Pour les cas de portage d'Ag HBs sans signe de réplication virale, le suivi se fera tous les six mois. Il n'y a pas d'indication pour un traitement antiviral.

b) Patients co-infectés par le VIH et les virus de l'hépatite B ou B-Delta.

Ils seront suivis au Centre de Traitement Ambulatoire de l'Hôpital Communautaire. Ceux qui sont éligibles pour un traitement de l'infection à VIH par les antirétroviraux recevront préférentiellement une trithérapie susceptible d'être active sur l'HBV comportant par exemple

le Ténofovir +Emtricitabine +Efavirenz (Atripla), à la posologie de 1 comprimé/jour en continu.

Les patients non éligibles pour les ARV, mais présentant une hépatite B-Delta chronique, pourraient bénéficier de la prescription de l'adéfovir (Hepsera) ou de la Telbivudine pour préserver les molécules à action antirétrovirales. Ces 2 molécules n'entrant pas dans les molécules disponibles auprès du Fond Mondial, il sera nécessaire de proposer auprès de l'ANRS et des firmes Gilead et BMS une nouvelle étude, (par exemple pour l'appel 2010-1), en fonction des résultats préliminaires que nous allons obtenir et du nombre de patients qui nécessiteraient effectivement un traitement de façon à budgétiser correctement auprès des firmes, des agences et des instituts ce projet thérapeutique. Au vu des recommandations actuelles, nous pensons que le nombre de patients de ce groupe sera faible. Cependant, il sera nécessaire envisager et de développer une stratégie thérapeutique au long cours en lien avec les acteurs locaux.

Les modalités de suivi biologique et clinique proposées ci dessus, sont également valables dans le cas des femmes enceintes et à des degrés variables, en Pédiatrie. Nous nous attendons à ce que la vaccination proposée prévienne la totalité des infections VHB chez les enfants.

6.3.2. Réalisation des prélèvements

Pour le dépistage, nous utiliserons le Dried Blood Spot (DBS) qui consiste à prélever quatre spots de deux gouttes de sang sur du papier filtre Schleicher & Scheull 2992 ensuite de les sécher à température ambiante.

Pour les cas confirmés HBV et HDV positifs, 10 ml de sang veineux seront prélevés au niveau du pli du coude dans un tube sec. Le sang sera centrifugé et le sérum sera aliquoté :

- 1 ml pour la sérothèque
- 0,5 ml chaque pour les différentes analyses

Le choix de cette stratégie est clair : il est évident en terme de coût et de facilité de prélèvement qu'un dépistage d'un grand nombre d'individu est facilité par l'utilisation du Dried Blood Spot. De plus les expériences menées à Bangui indiquent déjà la faisabilité de ce protocole. Enfin des résultats préliminaires menés à Bobigny ont également démontré qu'il était possible de détecter si cela était nécessaire l'ARN HDV et l'ADN HBV à partir d'échantillons prélevés sur papiers buvard en Amazonie et resté à température ambiante pendant 15 jours avant d'être placé à 4°C.

La convocation des personnes positives pour l'Ag HBs aura le mérite de sensibiliser les patients sur leur suivi médical dans le but de pouvoir (à coté du prélèvement veineux) bénéficier d'une consultation en milieu hospitalier (collaboration avec l'équipe des cliniciens), préambule à l'élaboration d'une stratégie thérapeutique à placer au sein ou en dehors d'un protocole à définir en fonction du nombre de patients dépistés positifs pour l'AgHBs associé ou non aux anti-delta.

6.3.3. Population d'étude

Pour assurer une représentativité de l'échantillon au niveau de la ville de Bangui, il sera procédé à un échantillonnage au sein des 8 arrondissements. Un service de santé maternelle et infantile (SMI) et un lycée seront sélectionnés par tirage au sort au niveau de chaque arrondissement.

La population d'étude sera composée :

- D'élèves et d'étudiants. Il sera procédé par un échantillonnage aléatoire en grappes, stratifié sur le type d'institution de formation (strate N°1 = écoles secondaires ; strates N°2 = université de Bangui avec toutes les facultés). Ainsi, les établissements scolaires et universitaires suivants ont été sélectionnés :

- Au niveau des établissements scolaires publics : Lycée Barthélémy Boganda, Technique, Marie Jeanne Caron, des Rapides, Miskine, Gobongo, Fatima, Bimbo, Martyrs, d'Application de l'Ecole Normale Supérieure,
- Au niveau des établissements scolaires privés : Lycée PIE XII, Saint Charles, CPI, CPJ, New Tech, Jean Marie.
- Au niveau de l'Université :
 - Toutes les Facultés, les Instituts et les Ecoles Supérieures Publiques
 - Les Ecoles Supérieures privées : Hautes Etudes de Gestion, Faculté de Droit Walombé, Collège Jean Marie
- De femmes enceintes lors de la consultation prénatale du 3^{ème} trimestre (Hôpital Communautaire, les services de SMI des Centres de Santé de Bégoua, Boy Rabe, Castors, Ouango),
- De nouveau-nés et des bébés de 0 à 6 mois après consentement éclairé des parents (Centre Pédiatrique de Bangui).

6.4. Les méthodes utilisées

6.4.1. Elution du sang à partir du papier buvard

C'est une technique couramment utilisée par le laboratoire des hépatites de l'Institut Pasteur de Bangui. La sensibilité et la spécificité de la technique DBS ont été comparées à celles de la technique utilisant le sérum à partir du sang veineux. Les résultats ont révélé une perte de sensibilité négligeable et une quasi-absence de perte de spécificité (moins de 5%).

L'utilisation d'un perforateur de 6 mm de diamètre permet d'obtenir des disques contenant du sang séché sur le papier buvard de même diamètre. Les disques découpés sont déposés chacun dans un tube eppendorf de 2 ml en présence de 500 µl d'eau physiologique ou d'une solution de *Phosphate Buffer Saline*, PBS (aucune différence d'élution n'a été notée avec l'eau physiologique et le PBS). Les disques sont laissés en contact de la solution physiologique pendant 24h. Les tubes sont ensuite agités pendant 15 min et centrifugés à 16.000 tr/min pendant 1min. Le surnageant est récupéré dans un tube eppendorf propre et la quantité pour chaque test est prélevé selon les recommandations des fabricants (50 µl AgHBe ; 100 µl AgHBs ; 100µl AgHDV ; 100 µl anti-HBc ; 50 µl anti-HBe ; 50 µl anti-HDV). Le reste de la solution peut être conservé à 4°C pendant 1 semaine.

6.4.2. Détermination des AgHDV et des anticorps anti-HDV

Le dépistage de l'infection delta sera réalisé à l'Institut Pasteur de Bangui en collaboration avec les services de la SMI de l'Hôpital Communautaire et des 5 Centres de Santé Urbain, et le Complexe Pédiatrique. La sérologie (à savoir recherche des anticorps anti-HDV totaux (IgM anti-delta et IgG anti-delta)) sera réalisée systématiquement par une technique de compétition (de type DiaSorin) sur tous les échantillons des patients porteurs chroniques d'AgHBs. En revanche, en raison de sa faible sensibilité, (2 prélèvements positifs sur 78 testés en 1985) l'antigène HDV (DiaSorin) ne sera pas systématiquement recherché afin de minimiser les coûts des tests sérologiques.

6.4.3. Génotypage des souches des virus de l'hépatite D et B isolées en Centrafrique

Localisé à Bobigny (Hôpital Avicenne Université Paris 13), le Laboratoire Associé au Centre National de Référence des Hépatites B, C et delta dispose de l'ensemble des techniques développées pour caractériser les infections virales hépatotropes B, C et delta.

Pour l'infection delta, l'ensemble des techniques est décrit dans les publications citées en référence. (RT-PCR qualitative, RT-PCR quantitative, Séquençage et Analyses phylogénétiques)

Pour l'HBV, les approches reposent sur des tests commerciaux ou « maisons » développées dans le cadre de l'action concerté 11 de l'ANRS, groupe HBV-HIV résistance.

Il possède l'infrastructure informatique nécessaire aux analyses phylogénétiques.

6.5. Analyse des données

Les données seront saisies et analysées à l'aide du logiciel Epi Info version 3.3.4. Nous procéderons en premier lieu à une analyse descriptive (pourcentages avec des intervalles de confiance à 95%) en fonction des résultats de séropositivité à l'AgHBs et à l'anticorps anti-HDV. Nous rechercherons ensuite, suivant la catégorie de sujets de notre étude (femmes enceintes d'une part, élèves et étudiants d'autres part), l'effet de l'âge, sexe, la résidence, antécédents familiaux, antécédents médicaux (risques d'exposition aux produits sanguins), antécédents sexuels sur la positivité AgHBs et anticorps anti-HDV. Les facteurs qui seront significativement associés à cette séropositivité (au seuil de 10%) lors de notre analyse univariée seront introduits dans une analyse multivariée.

6.6. Implication de chaque personne dans la recherche

Les Coordinateurs et Co-investigateurs du projet sont le Dr Narcisse Patrice Komas et le Pr. Paul Dény.

6.6.1 – Equipe du Laboratoire des Hépatites Virales de l'Institut Pasteur de Bangui, Centrafrique

- Un technicien vacataire au laboratoire des hépatites, s'occupera du volet sérologie
- Dr Alexandre Manirakiza est l'épidémiologiste qui se charge de toutes les analyses épidémiologiques
- Dr Claudine Békondi, chercheur dans le laboratoire des hépatites virales, travaillera sur la caractérisation des hépatites B/D
- L'analyse des résultats se fera pour Bangui par le Dr Narcisse Komas et le Pr. Alain Le Faou
- Dr Narcisse Komas : chef du laboratoire des hépatites de l'Institut Pasteur de Bangui, assure la rédaction du projet et l'organisation de toutes la stratégie et des méthodologies ainsi que la coordination sur Bangui et le transfert des échantillons.

6.6.2 – Equipe des Cliniciens, Bangui, Centrafrique

- Pr Sépou, Gynécologue, assurera le prélèvement et le suivi médical des femmes enceintes AgHBs-Hépatite D positives dans son service à l'Hôpital Communautaire de Bangui
- Dr Gody, Pédiatre, assurera le prélèvement et le suivi médical des bébés de 0 à 6 mois au Complexe Pédiatrique de Bangui
- Dr Fikouma, Infectiologue, suivra les sujets co-infectés hépatites B/D et HIV au niveau du Centre de Traitement Ambulatoire de l'Hôpital Communautaire de Bangui
- Dr Ouavéné, Interniste, assurera le suivi médical de tous les autres sujets au niveau de son service de Médecine Interne à l'Hôpital de l'Amitié de Bangui

6.6.3 – Equipe du Laboratoire de Bactériologie, Virologie – Hygiène de l'Hôpital Avicenne, Bobigny, France

- Mariama Abdou : Doctorante à l'université Paris 13, assurera les travaux d'extraction de clonage et de séquençage des isolats de 2009 et d'une fraction des isolats des années 80
- Emmanuel Gordien : MCU-PH responsable du laboratoire de recherche sur le virus delta sur le site de Bobigny ; encadre Mariama Abdou dans ses travaux et encadrera le technicien en provenance de l'IP Bangui pour le transfert des techniques.
- Paul Dény : chef du laboratoire, actuellement en contrat d'Interface Inserm au sein de l'équipe C (cf infra) assure l'écriture du projet en lien avec l'équipe B et C, assure la bonne coordination avec Bangui, répartira les échantillons anciens entre Lyon et Bobigny en vue de reproduire les résultats obtenus sur ces échantillons anciens sur les 2 sites.

6.6.4 – Equipe de l'Unité INSERM U871, Lyon, France

- Olivier Hantz, acteur du projet initial, de 1987, spécialiste des transmissions expérimentales du clonage et du séquençage initial participe au choix de toute la stratégie actuelle et des méthodologies employées
- Alan Kay, acteur du projet initial, de 1987, spécialiste des transmissions expérimentales du clonage et du séquençage initial, spécialiste des hépatites fulminantes delta en Amazonie, participe au choix de toute la stratégie actuelle et des méthodologies employées

- Christian Pichoud, participant au projet initial, de 1987, Ingénieur Inserm, participe au choix des échantillons à analyser en fonction de leur état de conservation et des résultats initiaux
- Christian Trépo, co-découvreur du virus de l'hépatite delta, est acteur du projet initial, de 1987, participe au choix de toute la stratégie actuelle et des méthodologies employées,
- Fabien Zoulim, directeur du laboratoire, coordonne le projet sur Lyon en lien avec Bobigny et Bangui
- Paul Dény, (cf supra) contrat d'interface Inserm dans l'unité de Fabien Zoulim, assure en particulier la synergie entre Lyon et Bobigny. Il assurera la répartition en quantité aliquote des échantillons anciens à tester en parallèle dans les laboratoires A (Bobigny) et C (Lyon).

7 – ECHEANCIER, RESULTATS ET RETOMBES ATTENDUS

7.1. Echéancier

Préparation de l'étude, campagne d'information : avril-mai 2009

Début de l'étude : mai 2009

Durée de l'étude : 24 mois

Rapport final : avril-juin 2011.

7.2 – Programmation des activités principales

Institut Pasteur de Bangui	CHU Avicenne Bobigny	U871 Lyon
<p>Avril 2009 Campagne d'information</p> <p>Mai - octobre 2009 - Recrutement des sujets dans les Lycées, à l'Université, dans les services de santé maternelle et infantile de l'Hôpital communautaire, des Centres de Santé de Bégoua, Boy Rabe, Castors, Ouango et au Complexe Pédiatrique de Bangui</p> <p>- Sérologie hépatite B et Delta</p> <p>Mai 2010 Mise en place des techniques de PCR et de caractérisation de l'hépatite B et Delta après Transfert de technologie depuis Avicenne</p> <p>Mai – juin 2011 Fin de l'étude. Rédaction du rapport final</p>	<p>Mai – octobre 2009 Screening PCR prévu en parallèle des échantillons rétrospectifs 1984-1987 sélectionnés par le laboratoire C</p> <p>Novembre 2009 – avril 2010 Position de stage d'un chercheur de l'Institut Pasteur de Bangui sur les techniques de RT-PCR qualitative, RT-PCR quantitative du virus de l'hépatite B et du virus de l'hépatite delta</p> <p>2009 – 2011 Etude de l'association évolutive des binômes HBV – HDV Les variations du génome de l'HDV au sein de la population Centrafricaine</p>	<p>Mai 2009 –Avril 2010</p> <p>Sélection des sérum disponibles en quantité raisonnable (>300 µl) au sein des boîtes « Bangui »</p> <ul style="list-style-type: none"> -hépatites fulminantes -hépatites chroniques - Famille des patients - Témoins <p>extraction dans un laboratoire exempt d'ARN ou de cDNA HDV. Répartition en quantité aliquote. Envoi au laboratoire A d'un aliquot</p> <p>2010-2011 Mise en place de l'amplification R0 en screening des échantillons et séquençage ; résultats devant reproduire ceux du laboratoire A pour validation des résultats obtenus sur ces échantillons anciens</p>

7.2. Résultats attendus :

Cette étude a pour finalité d'obtenir des données précises sur la prévalence et l'évolution de l'hépatite delta en Centrafrique à partir de l'étude d'une ville (Bangui) et d'identifier les souches de ce virus en circulation dans la population.

Un autre volet des résultats attendus est l'utilisation des résultats pour appuyer la mise en place de la vaccination contre l'hépatite virale B et prévenir l'infection chez les enfants. Cette prévention se fera également au niveau de la transfusion sanguine et de comportement sexuel à risque. Ces résultats serviront également à faire un plaidoyer auprès des autorités centrafricaines pour leur engagement dans la mise en place d'une politique de suivi thérapeutique des personnes infectées par ces virus.

Enfin ce projet s'inscrit dans la politique générale de l'ANRS concernant les pays en voie de développement, qui tend i) à faire travailler en synergie les différents spécialistes présents dans les structures des pays développés et ceux des pays en développement, ii) à conjuguer recherche appliquée et recherche plus fondamentale, iii) à s'engager dans un programme de recherche stratégique visant les infections dues aux hépatites virales à transmission parentérale et sexuelle. Ce projet est également un projet de Santé Publique qui mettra à la disposition de la République Centrafricaine, des spécialistes de disciplines complémentaires pour mieux contrôler ces infections.

8 – CONDITIONS DE MISE EN PLACE DU PROJET

8.1. Descriptions des examens

8.1.1. Sérologie

Les sangs prélevés sur papier buvard, DBS, seront acheminés à l'Institut Pasteur de Bangui pour les examens sérologiques. Le DBS est un procédé de choix en raison de sa facilité pour l'obtention des prélèvements sanguins. Il permet de réduire le volume de matériels à transporter.

Les AgHBs et anticorps anti-HBc totaux et anticorps anti-HDV seront recherchés. En cas de positivité, le participant sera re-contacté pour un prélèvement veineux : 10 ml de sang seront prélevés sur tube sec et le sérum sera aliquoté. Une partie sera envoyée à Avicenne pour les études de biologie moléculaire et l'autre partie sera conservé dans la sérothèque de l'IPB.

8.1.2 – Biologie moléculaire

Pour chaque échantillon retenu anti-HDV positif et témoin AgHBs positif, le sérum sera conservés à -80°C puis acheminé collectivement en France via le réseau des Instituts Pasteur. Le virus Delta est un virus à ARN dont le génome est relativement résistant compte tenu de la structure pseudo double-brin. Après extraction d'ARN (colonnes Quiagen), l'ARN viral est dénaturé, rétro-transcrit et amplifié dans la région R0 du génome viral (Ivaniushina et al., 2001). Les analyses phylogénétiques effectuées (Radjef et al., 2004 ; Le Gal et al., 2006) indiquent la position phylogénétique de l'échantillon. En parallèle, sur les échantillons positif prélevé en 2008 une quantification de l'ARN HDV sera effectuée par PCR temps réel à l'aide des sondes TaqMan® selon le protocole décrit in Le Gal et al., 2005. Le génotypage de l'HBV associé des données de séquence de la région Prés1 (Hémi-nested PCR) et de la Polymérase (Consensus AC11). La recherche de recombinants et de Mutants AgHBe négatif s'effectue par le séquençage de la région Pré-C. La quantification est assurée par des kits commerciaux.

8.2 – Recrutement des participants

8.2.1 – Taille de l'échantillon

Pour calculer la taille de notre échantillon d'étude, nous avons utilisé la formule suivante :

$$n_o = D \frac{z^2 pq}{i^2} \text{ où}$$

- n_o est la taille de l'échantillon
- p est la proportion théorique et $q = 1-p$.
- i est l'erreur type tolérable;

- D est l'effet grappe, (effet dû au fait que des élèves ou étudiants du même grappe ou classe auront plus de chance d'avoir des facteurs de risque vis-à-vis de l'HBV communs que s'ils sont directement tirés au sort). L'effet grappe est fixé à 1.
- z est la valeur de la variable normale qui correspond à la valeur de la probabilité de confiance. Avec un choix d'un intervalle de confiance à 95%, $z = 1.96$

Au niveau des élèves et étudiants, pour une séroprévalence théorique (p) de l'AgHBs estimée à 15,5% (prévalence relevée en milieux scolaire et universitaire) et en consentant pour une marge d'erreur tolérable pour les résultats (i) de 2% et un intervalle de confiance = 95% ($z = 1,96$), le calcul donne un échantillon d'enquête de 1257 élèves et étudiants.

Dans le cas des femmes enceintes, l'étude se déroulera dans les cinq (5) centres de santé de Bangui qui disposent de services de santé maternelle et infantile (SMI). La taille requise pour l'échantillon de l'étude a été calculée à partir de l'estimation attendue de la prévalence des AgHBs dans la population adulte.

Pour une séroprévalence théorique (p) de l'AgHBs estimée à 13% chez la femme adulte, et en respectant les mêmes conditions d'évaluation que précédemment, le calcul donne un échantillon d'enquête de 1087 femmes enceintes. Pour cet échantillon, nous nous attendons à avoir 142 femmes enceintes AgHBs positif qui seront suivies jusqu'à l'accouchement. Néanmoins en tenant compte du risque de pertes de vue lors de l'accouchement, nous avons estimé qu'un total de 200 femmes enceintes AgHBs positif doivent être recrutées.

Pour les bébés de 0 à 6 mois, l'échantillon sera de 790 pour une séroprévalence de 9% dans cette tranche d'âge.

La taille définitive de l'échantillon sera de 3134 participants dont 1257 élèves et étudiants, 1087 femmes enceintes et 790 bébés de 0 à 6 mois.

8.2.2. Critères d'inclusion des sujets

Tout élève ou étudiant ayant un AgHBs positif. Toute femme enceinte porteuse d'AgHBs. Tout bébé né d'une mère AgHBs positifs dont les parents ont librement consentis à ce qu'il soit prélevé.

8.2.3. Critères d'exclusion des sujets

Refus de participer à l'étude.

8.3 – Rédaction de la notice d'information et du consentement

La notice d'information et du consentement se trouve en annexe du document.

9 – COMPOSANTE ETHIQUE

Les principaux points des aspects éthiques ont été traités dans le corps du projet. Dans tous les cas, la charte d'éthique de la recherche dans les pays en voie de développement de l'ANRS, les lignes directrices internationales d'éthique pour la recherche biomédicale impliquant des sujets humains élaborées par le Conseil des organisations internationales des Sciences Médicales (CIOMS) avec la collaboration de l'OMS ainsi que les lignes directrices pour la revue éthique des études épidémiologiques seront suivies pour ce projet. L'ensemble des personnes impliquées dans l'étude s'engage à réaliser le projet conformément au protocole, à la déclaration d'Helsinki adoptée par l'Assemblée Médicale Mondiale (52^{ème} Assemblée Générale, version 2000 amendée en 2002) et aux recommandations de Bonnes Pratiques Cliniques (ICH 1996).

Contexte particulier à la RCA : Un projet de loi portant sur la création d'un Comité de Protection des Personnes en Recherche Biomédicale, COPREBI a été préparé lors d'un séminaire national regroupant les principales sensibilités socioculturelles, religieuses et scientifiques du pays en 2004. Le Ministère de la Santé Publique et de la Population et celui de l'Education Nationale et de la Recherche Scientifique n'ont pas encore soumis le texte au débat parlementaire pour son examen et adoption définitive.

En attendant le projet a reçu l'avis favorable du Comité Scientifique de la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université de Bangui (ce comité joue le rôle de comité éthique) et la demande de l'autorisation de recherche déposée auprès du Ministère en charge de la Santé et de la Population est en cours d'examen. Les recrutements se feront sur la base de volontariat et tous les participants seront informés de l'objectif du projet. Ils pourront refuser de participer à l'étude sans que cela ne porte préjudice au diagnostic biologique de leur infection. L'information leur sera donnée dans les deux langues officielles de la République Centrafricaine (français et sango) et le consentement éclairé est obtenu avant l'enrôlement dans l'étude.

10 – PROPOSITION DES MEMBRES DU COMITE INDEPENDANT

Les 4 personnes suivantes sont proposées pour être membre du Comité Indépendant

- Pr Gérard Grésenguet : Médecin de Santé Publique, Doyen de la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université de Bangui, RCA
- Dr Jean Abéyé : Pharmacien, Chef du Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Santé, RCA
- Dr Wilfried Nambéi : Pharmacien, Directeur du Laboratoire National de Biologie Clinique et de Santé Publique de Bangui, RCA
- Pr Dominique Roulot, Hépatologue, Hôpitaux Avicenne et Jean Verdier, Université Paris 13, Bobigny, France

11 – ARCHIVAGES

Le responsable scientifique archivera et conservera pendant au moins 10 ans après la fin de l'étude les documents suivants :

- Versions du projet, annexes (et amendements éventuels).
- Correspondances relatives à l'étude (y compris les éléments administratifs et financiers).

12 – PROTECTION ET VALORISATION DES RESULTATS DE L'ETUDE

L'analyse des données sera faite par l'Institut Pasteur de Bangui. L'analyse donnera lieu à un rapport écrit qui doit permettre la préparation de publications.