



**HAL**  
open science

# Validation de méthode de la trousse EurobioPlex qRT-PCR Hépatite Delta au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux

Tania-Stefana Mihailescu

► **To cite this version:**

Tania-Stefana Mihailescu. Validation de méthode de la trousse EurobioPlex qRT-PCR Hépatite Delta au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02864375

**HAL Id: dumas-02864375**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02864375>**

Submitted on 11 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université de Bordeaux**  
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2020

N° 3019

Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement  
le 3/04/2020 par

**Tania-Stefana MIHAILESCU**

Née le 25 Décembre 1989 à Suceava

**Validation de méthode de la trousse EurobioPlex qRT-PCR  
Hépatite Delta au laboratoire de virologie du CHU de  
Bordeaux**

Directeur de thèse : Mme le Professeur Marie-Edith LAFON

**Membres du jury**

Mme le Professeur Cécile BEBEAR	Président
Mme le Docteur Pascale TRIMOULET	Membre
Mme le Professeur Véronique DUBOIS	Rapporteur
Mme le Professeur Laurence DELHAES	Membre

**Université de Bordeaux**  
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2020

N° 3019

Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement  
le 3/04/2020 par

**Tania-Stefana MIHAILESCU**

Née le 25 Décembre 1989 à Suceava

**Validation de méthode de la trousse EurobioPlex qRT-PCR  
Hépatite Delta au laboratoire de virologie du CHU de  
Bordeaux**

Directeur de thèse : Mme le Professeur Marie-Edith LAFON

**Membres du jury**

Mme le Professeur Cécile BEBEAR	Président
Mme le Docteur Pascale TRIMOULET	Membre
Mme le Professeur Véronique DUBOIS	Rapporteur
Mme le Professeur Laurence DELHAES	Membre

## REMERCIEMENTS

---

### **A mon Président de jury, Madame le Professeur Cécile BEBEAR**

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez accepter mon profond respect et mes plus sincères remerciements.

### **A mon Directeur de thèse, Madame le Professeur Marie-Edith LAFON**

Vous avez accepté, très gentille, de diriger ce travail de thèse. Je vous remercie pour votre patience, disponibilité et soutien tout au long de sa réalisation. Votre aide est précieuse. Je vous témoigne ma profonde et respectueuse reconnaissance.

### **A mon Rapporteur, Madame le Professeur Véronique DUBOIS**

Vous me faites l'honneur d'être le rapporteur de ce travail. Je vous remercie d'avoir accepté d'apporter des critiques à ce sujet. Soyez assurée de ma respectueuse reconnaissance.

### **Au membre du jury, Madame le Docteur Pascale TRIMOULET**

Vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury. Je vous remercie pour la contribution que vous avez portée à ce travail et d'avoir été disponible pour répondre à mes questions. Veuillez accepter mes remerciements les plus sincères.

### **Au membre du jury, Madame le Professeur Laurence DELHAES**

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour votre gentillesse et votre soutien. Soyez assurée de ma sincère considération.

J'adresse mes remerciements également :

**Aux biologistes, techniciens et autres membres du laboratoire de l'Hôpital Haut-Lévêque**, où j'ai passé ma première année d'internat. Merci pour votre accueil, gentillesse et compréhension (même quand j'employais des mots « pas très français »). Je remercie également Marie Tuffigo pour sa bienveillance.

**Aux biologistes et techniciens du laboratoire de l'Hôpital Pellegrin**, qui m'ont appris tellement de choses et parmi lesquels j'ai trouvé des exemples qui m'ont motivé dans ce chemin de Biologie Médicale.

**A toute l'équipe du laboratoire de virologie** et tout particulièrement à Laureline, merci pour ton aide et toutes les explications techniques qui ont rendu possible ce travail.

**Aux co-internes** : Diana, Cécile, Pierre-Elian, Emilie, les réunionnais Elvina, Alexandre et Benjamin, Elodie, Florian, Guillaume, And-Nan, la petite Ludivine, Anne-Sophie, Claudia, Andreea et Valentin. Merci pour votre présence tout au long de l'internat, que ce soit pendant les stages, pendant une garde ou bien juste autour d'un chocolat.

Un remerciement en particulier aux co-internes de virologie : Camille, Charly et Stéphane. Vous m'avez beaucoup aidé dans ce travail, surtout avec vos expériences de qualitatifs et mathématiciens. Merci pour votre sympathie et votre disponibilité.

Sans vous tous, l'internat n'aurait pas été pareil.

**Aux amies**, Cezara et Loredana. Un seul geste au bon moment vaut mille mots, merci infiniment pour votre présence à mes côtés.

**A ma famille,**

A ma maman, sans laquelle rien n'aurait été possible. Je te remercie de m'avoir soutenu pendant toutes ces années. L'amour inconditionnel entre les enfants et leurs parents montre, encore une fois, que tout est possible. Même si tu étais loin, tu as toujours été dans mon cœur, et ça m'a rendu plus forte.

A mon père, à mes deux grands frères et à mon beau-père. Merci pour tous vos bons conseils et pour vos encouragements. La famille c'est comme les branches d'un arbre : nous grandissons tous dans différentes directions, mais nos racines sont les mêmes.

A ma future belle-famille. Toujours accueillante, je me suis sentie adoptée très peu de temps après notre rencontre.

**A mon futur époux Alexis,**

Merci d'avoir eu autant de patience pour cette « petite roumaine », merci pour ton soutien et pour toutes tes preuves d'amour. Tu ne m'as jamais laissé tomber, même dans les moments les plus difficiles. Mais les routes difficiles conduisent souvent à de belles destinations, n'est-ce pas ? J'ai hâte de continuer ce beau voyage avec toi, pour tout le reste de ma vie.

**Nihil sine Deo**

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
SOMMAIRE .....	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	7
ABREVIATIONS .....	9
INTRODUCTION .....	11
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	12
I. Généralités .....	12
I.1. Le virus de l'hépatite Delta.....	12
I.1.1. Structure du virion du VHD.....	12
I.1.2. Cycle viral du VHD .....	14
I.2. Le rôle pathogène du VHD .....	17
I.2.1. Transmission.....	17
I.2.2. Présentation clinique et progression.....	18
II. Epidémiologie des infections VHD .....	23
II.1. Dans le monde .....	23
II.2. En France.....	27
III. Méthodes diagnostiques .....	30
III.1. Identification de l'infection par VHD .....	30
III.1.1. Marqueurs sérologiques.....	30
III.1.2. Marqueurs moléculaires .....	32
III.1.3. Modèles de domination virale.....	35
III.2. Évaluation de la maladie hépatique .....	36
IV. Traitements.....	38
IV.1. Traitement de l'hépatite Delta aiguë .....	39
IV.2. Traitement de l'hépatite Delta chronique .....	39
IV.2.1. PEG-IFN.....	39
IV.2.2. Inhibiteurs de l'entrée virale : Bulevirtide® .....	41
IV.2.3. Inhibiteurs de l'assemblage viral .....	49
IV.2.4. Polymères d'acides nucléiques.....	49
IV.3. Traitement du CHC .....	49

IV.4. Prévention.....	50
PARTIE II : TRAVAUX PERSONNELS .....	51
I. But de l'étude .....	51
II. Matériels et méthodes .....	52
II.1. Echantillons.....	52
II.2. Automates.....	53
II.3. Trousse EurobioPlex VHD qRT-PCR .....	54
II.4. Réalisation de la PCR VHD.....	55
II.5. Validation de la PCR VHD.....	56
II.6. Analyse des données et interprétation .....	57
III. Résultats .....	58
III.1. Utilisation du Standard OMS .....	58
III.2. Gammes de quantification VHD-QS .....	61
III.3. Comparaison de méthodes .....	63
III.4. Répétabilité.....	68
III.5. Reproductibilité .....	72
III.6. Analyse de risques.....	74
IV. Cas cliniques.....	79
PARTIE III : DISCUSSION.....	90
CONCLUSION.....	92
ANNEXES.....	93
BIBLIOGRAPHIE .....	95

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

### Figures

Figure 1. La particule virale VHD .....	13
Figure 2. Représentation schématique en 12 étapes de la réplication du virus de l'hépatite delta dans l'hépatocyte .....	16
Figure 3. Les différents ARN VHD dans la cellule hépatique .....	16
Figure 4. Modes de transmission du VHD .....	18
Figure 5. Comparaison schématique de l'évolution de la coinfection VHB / VHD (a) et de la surinfection (b) d'un patient VHB avec VHD .....	19
Figure 6. Probabilité cumulée d'apparition d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) chez les patients présentant une cirrhose de type B compensée (Child A) en relation avec le statut du VHD et de l'AgHBe .....	21
Figure 7. Les étiologies de la cirrhose dans une population de patients infectés par le VIH .....	22
Figure 8. Séroprévalence du VHD parmi trois populations positives pour l'AgHBs .....	25
Figure 9. Répartition mondiale des génotypes et sous génotypes VHD .....	26
Figure 10. Origine géographique des patients VHD positifs en France (en %) .....	28
Figure 11. Proportion (%) des différents génotypes VHD caractérisés en France .....	28
Figure 12. Répartition des génotypes et sous génotypes en France .....	29
Figure 13. Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques lors d'une infection par le VHB et le VHD .....	31
Figure 14. Comparaison des charges virales VHD dans le sérum et dans le plasma .....	34
Figure 15. Aspect des varices œsophagiennes en endoscopie .....	36
Figure 16. Score de Child-Pugh .....	37
Figure 17. Carcinome hépatocellulaire en tomodensitométrie caractérisé par une prise de contraste au temps artériel .....	38
Figure 18. Résultats en pourcentage de réponse virologique à long terme dans les principales études cliniques sur l'efficacité d'un traitement par l'INF-PEG dans les infections chroniques B-delta. ....	40
Figure 19. Prise en charge des coinfections/surinfections Delta.....	41
Figure 20. Modèle d'entrée du VHB et du VHD dans les hépatocytes .....	42
Figure 21. CV VHD dans la période Mars 2018 – Aout 2019 au CHU de Bordeaux .....	52
Figure 22. MagNA Pure Compact ROCHE.....	53
Figure 23. Schéma du principe de purification d'acides nucléiques à l'aide du MagNA Pure Compact .....	53
Figure 24. LightCycler 480 ROCHE .....	54
Figure 25. Extraction d'ARN d'un échantillon .....	55
Figure 26. Protocole de qRT-PCR.....	55

Figure 27. Dilutions des standards VHD-QS .....	57
Figure 28. L'efficacité de la PCR sur le canal FAM .....	59
Figure 29. Dilutions du Standard OMS .....	59
Figure 30. Calcul du coefficient de corrélation.....	60
Figure 31. Analyse du contrôle interne positif RC sur le canal HEX .....	61
Figure 32. L'efficacité de la PCR sur le canal FAM .....	62
Figure 33. Courbes d'amplification pour la série de 14 patients avec des charges VHD positives .....	65
Figure 34. Courbes d'amplification pour la série de 6 patients avec des charges VHD positives.....	65
Figure 35. Droite de régression linéaire CV VHD EurobioPlex qRT-PCR .....	66
Figure 36. Diagramme de Bland-Altman CV VHD EurobioPlex qRT-PCR.....	67
Figure 37. Réalisation des dilutions pour le niveau bas (A) et courbes d'amplification des échantillons de répétabilité charge faible (B) .....	68
Figure 38. Réalisation des dilutions pour le niveau haut (A) et courbes d'amplification des échantillons de répétabilité forte charge (B) .....	70
Figure 39. Réalisation des dilutions de faible charge positive.....	72
Figure 40. Réalisation des dilutions de forte charge positive .....	73
Figure 41. Quantification de la charge VHD – Corrélation entre le coffret EurobioPlex VHD et le CNR Delta pour tous les génotypes viraux .....	94
Figure 42. Spécificité et sensibilité clinique et diagnostique du coffret.....	94

## Tableaux

Tableau 1. Génotypes des nouvelles souches Delta caractérisées en France depuis 2001	29
Tableau 2. Marqueurs diagnostiques de l'infection à VHD et leur importance .....	35
Tableau 3. Résultats de l'étude clinique MYR 202 .....	44
Tableau 4. Résultats de l'étude clinique MYR 203 .....	45
Tableau 5. Effets indésirables du Bulevirtide® .....	48
Tableau 6. Sondes utilisées au cours de la PCR VHD .....	54
Tableau 7. Préparation du mélange réactionnel de la qRT-PCR VHD.....	55
Tableau 8. Programme qRT-PCR .....	56
Tableau 9. Valeurs de la gamme de quantification VHD-QS .....	56
Tableau 10. Comparaison des valeurs de la gamme de quantification VHD-QS .....	58
Tableau 11. Comparaison des valeurs de la gamme de quantification VHD-QS .....	63
Tableau 12. Patients avec charges VHD positives testés pour la comparaison de méthode	64

Tableau 13. Résultats numériques obtenus pour les 15 échantillons à faible charge virale VHD testés pour la répétabilité.....	70
Tableau 14. Résultats numériques obtenus pour les 15 échantillons à forte charge virale VHD testés pour la répétabilité.....	71
Tableau 15. Résultats conformité des tests de répétabilité.....	72
Tableau 16. Analyse de risque détaillée.....	78

## ABREVIATIONS

---

Ac : anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

ADV : adéfovir

AgHBc : antigène HBc (protéine de capsid)

AgHBe : antigène HBe (protéine d'export)

AgHBs : antigène de surface de l'hépatite B

AgHD : antigène de l'hépatite delta

ALAT : alanine aminotransférase

ARN pol : ARN polymérase

ARN : acide ribonucléique

ASAT : aspartate aminotransférase

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

CHC : carcinome hépato cellulaire

CNR : Centre National de Référence

Ct : Threshold cycle = valeur de cycle où le signal sort du bruit de fond

CV : charge virale

HCD : hépatite chronique Delta

hNTCP : récepteur polypeptidique co-transporteur du sodium taurocholate humain

HRSB : comportement sexuel à haut risque

IDVU : utilisation de drogues intraveineuses

IgG : Immunoglobulines de type G

IgM : Immunoglobulines de type M

L-AgHD : grande protéine de l'antigène delta

LAM : lamivudine  
M-AgHBs : protéine moyenne de l'antigène delta  
mITT : intention de traiter modifiée  
NAPs : polymères d'acides nucléiques  
ORF : Open Reading Frame = cadre de lecture ouvert  
PCR : Polymerase chain reaction  
PEG-IFN : interféron pegylé  
PSV : particules sous-virales  
qRT-PCR : PCR quantitative en temps réel  
RBV : ribavirine  
RC : contrôle interne  
RCA : République centrafricaine  
RNP : ribonucléoprotéine  
S-AgHD : petite protéine de l'antigène delta  
TDF : ténofovir  
VHB : virus de l'hépatite B  
VHD : virus de l'hépatite Delta  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

# INTRODUCTION

Le virus de l'hépatite Delta (VHD) a été découvert il y a plus de 40 ans par Rizzetto et ses collègues en Italie.(1) Il fut initialement décrit comme un nouveau système antigène-anticorps (delta / antidelta) chez les porteurs d'antigène de surface du virus de l'hépatite B (AgHBs). Des études ultérieures de transmission chez les chimpanzés ont montré que l'antigène Delta (AgHD) était la composante interne d'un nouveau pathogène transmissible, l'agent Delta. Du point de vue épidémiologique, l'agent Delta a été trouvé partout dans le monde, et s'est avéré être une cause majeure d'hépatite aiguë et chronique sévère.(2) Grâce à son importance médicale et ses caractéristiques virologiques uniques, l'agent Delta a été reconnu en 1983 comme un virus de l'hépatite distinct, désigné VHD, causant l'hépatite D.(3) Rizzetto l'appela « delta » parce que, d'une part, les noms A, B et non A-non B étaient déjà utilisés pour les autres hépatites et parce que, d'autre part, le profil de marquage par immunofluorescence des cellules infectées qu'il avait mises en évidence était distinct et indépendant de celui obtenu avec le virus de l'hépatite B (VHB) (AgHBs, pour la protéine de surface ; AgHBe pour la protéine d'export du virus et AgHBc pour la protéine de capsid).(4)

Cet agent Delta est un virus hépatotrope, satellite du VHB et unique membre du genre deltavirus.(5) L'infection à VHD ne peut survenir que chez les patients atteints d'hépatite B, qu'il s'agisse d'une co-infection simultanée ou d'une surinfection. (6) L'hépatite chronique D (HCD) est la forme d'hépatite virale chronique la moins commune mais la plus sévère à tous les âges (3), avec des signes cliniques de progression accélérée vers la cirrhose, un risque accru de carcinome hépatocellulaire et une décompensation précoce chez les patients atteints de cirrhose. (7)

Dans le monde, environ 240 millions d'individus sont AgHBs positifs, parmi lesquels 2 à 8% sont co-infectés par le VHD, il en résulte 10-20 millions de personnes souffrant d'hépatite delta. (6)

# PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. Généralités

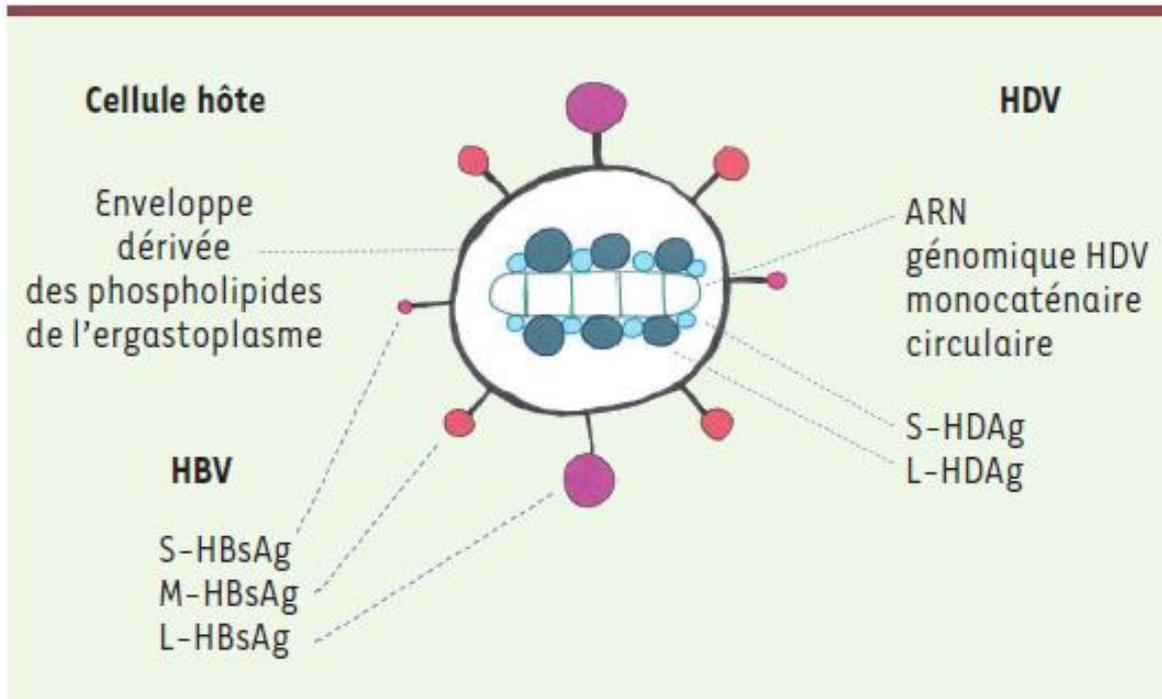
### I.1. Le virus de l'hépatite Delta

Le virus de l'hépatite Delta, aussi appelé virus de l'hépatite D ou VHD, est un agent viral défectif à ARN de polarité négative. Son génome est un petit ARN circulaire monocaténaire. Pour se propager, le VHD a besoin d'un autre virus, le VHB, qui lui fournit les protéines d'enveloppe nécessaires à l'assemblage de ses virions et à la propagation de l'infection. Les manifestations cliniques graves de l'infection combinée VHB-VHD vont des formes aiguës d'hépatites fulminantes aux formes chroniques de fibrose du foie (cirrhose), qui peuvent conduire à un carcinome hépatocellulaire.

Une originalité du VHD repose sur la ressemblance de son génome avec celui des viroïdes, des agents infectieux des plantes constitués de petits ARN circulaires non encapsidés. Dépourvu de toute activité réplique virale, le VHD doit utiliser l'activité ARN polymérase-ADN dépendante de la cellule qu'il infecte pour répliquer son ARN génomique.(4)

#### I.1.1. Structure du virion du VHD

Le virion du VHD est constitué d'une enveloppe d'origine cellulaire dans laquelle s'ancrent les protéines d'enveloppe du virus auxiliaire VHB et d'une ribonucléoprotéine (RNP) comprenant les composants spécifiques du virus Delta : son ARN génomique circulaire, de petite taille et de polarité négative, associé à l'antigène Delta (ou AgHD) dont il existe deux isoformes, la petite protéine (S-AgHD) et la grande protéine (L-AgHD). Le nombre exact de protéines codées par génome, le ratio entre L-AgHD et S-AgHD, ainsi que la configuration exacte de la RNP ne sont pas connus (**Figure 1**). (4)



**Figure 1. La particule virale VHD (4)**

La particule virale VHD infectieuse est une particule chimérique entre des composants externes fournis par le virus de l'hépatite B auxiliaire et des composants internes propres.

Le **génome** du virus de l'hépatite Delta est retrouvé dans les particules virales circulantes et dans les hépatocytes infectés.

Pendant la réplication virale dans les hépatocytes infectés, deux autres acides nucléiques peuvent être identifiés: le premier est l'ARN anti-génomique, un intermédiaire de réplication de polarité positive, qui contient comme le génome une séquence capable de s'auto-cliver et de se lier, nommée ribozyme, indispensable à la réplication du virus. (8) Le second est l'ARN messager, composé d'environ 800 paires de bases, qui code pour l'AgHD. Sa transcription à partir du génome étant assurée par l'ARN polymérase II cellulaire, cet ARN possède les mêmes caractéristiques qu'un ARN messager cellulaire.

La ribonucléoprotéine est entourée par une **enveloppe** constituée des lipides cellulaires et des trois formes des glycoprotéines de surface du VHB (petite – S-AgHBs, moyenne – M-AgHBs et grande – L-AgHBs). La grande protéine L-AgHBs est indispensable pour que la particule soit infectieuse. (9) L'ensemble de la particule virale a un diamètre de 35–37 nm (dimension intermédiaire entre la particule du VHB – 42 nm – et ses particules vides–22 nm). (10)

Il s'agit d'un virus défectif : si sa réplication peut se faire de manière autonome, sa sortie de la cellule, comme sa réentrée dans les cellules voisines, dépendent des protéines de surface du VHB. Il ne peut donc y avoir d'infection VHD isolée.(5)

En l'absence de VHB, la réplication du VHD dans des cellules de mammifères aboutit à la formation de ribonucléoprotéines (RNP) et à une accumulation des ARN du virus dans la cellule ; les RNP isolées ne peuvent pas bourgeonner et sortir de la cellule. En revanche, en présence des protéines d'enveloppe du VHB (AgHBs), elles rejoignent l'ergastoplasme où bourgeonnent les AgHBs qui, en enveloppant la RNP, libèrent le virion VHD des cellules hôtes. (11) L'enveloppe de la particule du VHD est constituée de 95 % de S-AgHBs, de 0 à 5 % de M-AgHBs et de 1 % de L-AgHBs. Ces proportions sont différentes de celles de l'enveloppe du VHB. (12)

La petite glycoprotéine S-AgHBs et la grande protéine L-AgHBs sont indispensables à l'assemblage des virions VHD et à leur entrée dans la cellule. Ces protéines interagissent en effet avec des glycanes (de type sulfates d'héparane) et avec le récepteur polypeptidique co-transporteur du sodium taurocholate humain (hNTCP). (13) L'adsorption et la pénétration des virus reposent en partie sur le domaine N-terminal (acides aminés 2 à 48) de la protéine L-AgHBs et dépendent de son acylation par un acide myristique. Ainsi, l'utilisation de peptides synthétiques mimétiques du domaine N-terminal de L-AgHBs empêche l'infection par VHD et par VHB *in vitro* et *in vivo*. (14) Ces peptides sont proposés en thérapeutique contre l'infection par le VHD. (4)

Actuellement en évaluation clinique pour le VHD, le Bulevirtide®, (Hépatère / MYR GmbH), un lipopeptide myristoylé de 47 acides aminés correspondant au segment pré-S1 N-terminal de la protéine L-AgHBs, inhibe l'entrée du VHB et du VHD par une inhibition compétitive de la liaison au récepteur. Les essais cliniques ont montré que le Bulevirtide®, induisait une réduction significative de l'ARN du VHD, mais cet effet était transitoire, la virémie ayant réapparu chez tous les patients après l'arrêt du traitement.(3)

### 1.1.2. Cycle viral du VHD

Le cycle viral du VHD peut être décrit en 12 étapes (**Figure 2**).

Le VHD entre dans sa cellule hôte, l'hépatocyte, par le même mécanisme que le VHB, c'est-à-dire via l'interaction de ses protéines d'enveloppe (notamment la forme longue de l'antigène de surface du VHB, L-AgHBs) et le récepteur cellulaire des deux virus, NTCP (human sodium taurocholate cotransporting peptide). (13) La ribonucléoprotéine virale est transportée dans le noyau, où l'ensemble du cycle répliatif a lieu, de façon indépendante de la réplication du VHB, grâce au signal de localisation nucléaire (NLS) des protéines AgHD.

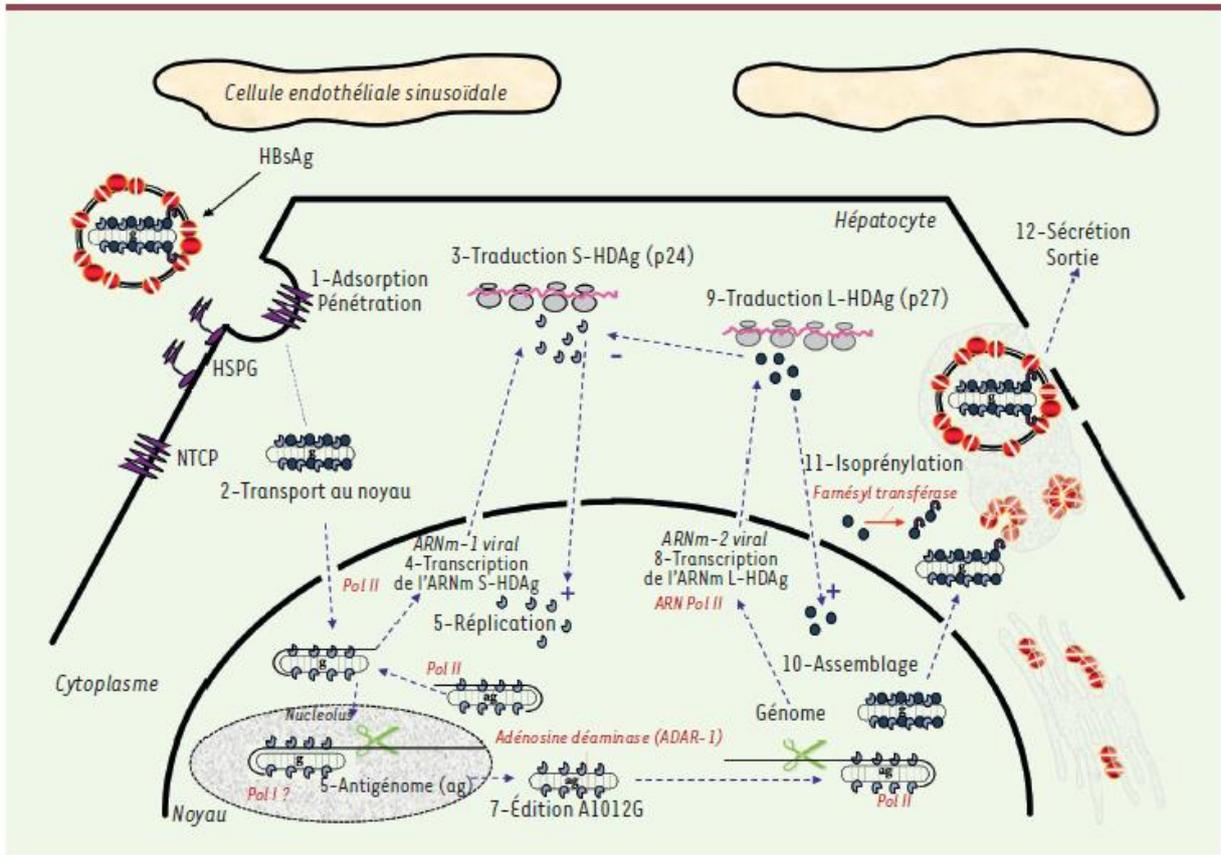
Le génome viral est amplifié par un mécanisme de réplication circulaire, permettant la synthèse de molécules multimériques d'ARN viral. Étant donné que l'AgHD n'a aucune activité enzymatique et que le VHD n'utilise pas la polymérase du VHB pour sa réplication,

le VHD détourne l'ARN polymérase ADN dépendante cellulaire (ARN pol II et éventuellement aussi l'ARN pol I) pour la transcription de son ARN. (15) La réplication des ARN génomique et anti-génomique produit des molécules linéaires contenant plusieurs copies répétées d'ARN-génomique ou d'ARN- antigénomique par un mécanisme de cercle roulant d'ARN. Ces molécules comprennent chacune une séquence nucléotidique ribozyme. Elles présentent donc une activité d'autoclivage qui hydrolyse les ARN linéaires néo-synthétisés en monomères, qui sont eux-mêmes circularisés de façon covalente, probablement par une ligase cellulaire. (16) Les trois formes d'ARN viraux sont alors décelées : génome circulaire (ARN-G), anti-génome (ARN-AG), et ARN messenger linéaire polyadénylé (AgHD-mRNA) (**Figure 3**). (17)

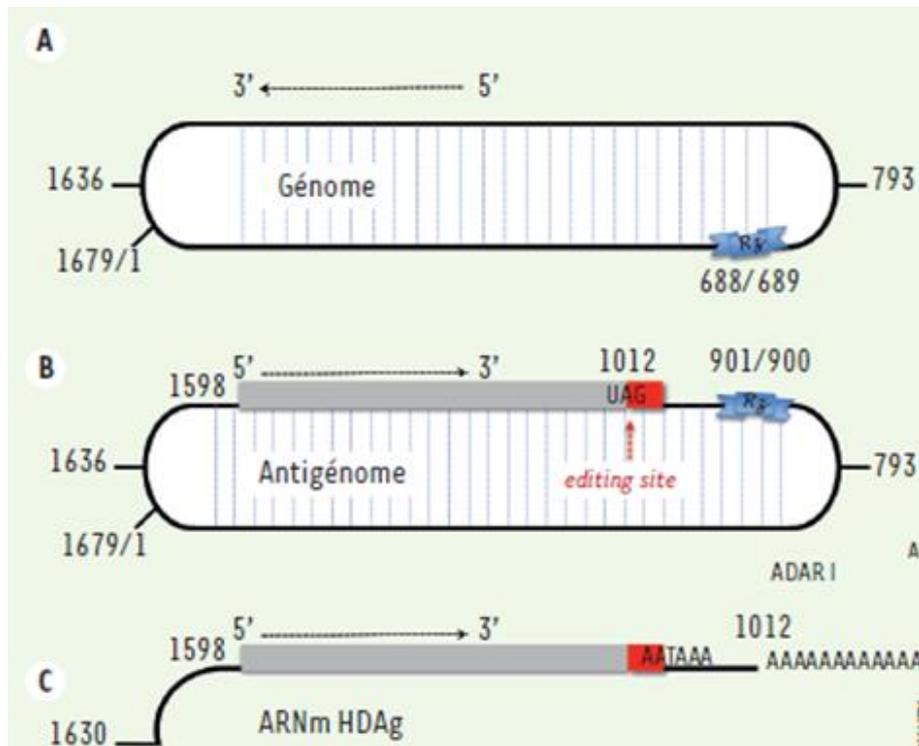
Les ARN messagers et génomiques sont ensuite transportés vers le cytoplasme, où l'ARN génomique pourra s'assembler aux protéines AgHD (traduites à partir de l'ARN messenger dans les ribosomes associés au réticulum endoplasmique) et former des ribonucléoprotéines. Pour l'assemblage et la sécrétion des particules virales VHD, la ribonucléoprotéine doit être enveloppée par les protéines de surface du VHB, grâce à l'interaction entre la grande protéine Delta (L-AgHD) et l'AgHBs. Cette interaction est dépendante d'une modification post-traductionnelle de l'AgHD (farnésylation). (18) Ainsi, même si le VHD peut entrer et se répliquer indépendamment dans les hépatocytes, lors d'une infection naturelle, le VHD ne peut être sécrété que par des cellules co-infectées par son virus auxiliaire, le VHB.(5)

La sortie virale dépendra de signaux d'export nucléaire de la grande protéine L-HDAg, de l'isoprénylation conférant une orientation membranaire de la RNP (modification post-traductionnelle) et surtout du bourgeonnement des AgHBs du VHB auxiliaire dans les voies de sécrétion de la cellule.(4)

Les particules virales du VHB sont assemblées et sécrétées à partir de la voie des corps multivésiculaires. En parallèle, des antigènes libres sont sécrétés (AgHBe, dont le dosage est utilisé comme un marqueur de l'activité répliquative du virus) ainsi que des particules dites sous-virales (PSV), composées uniquement par des protéines de surface (AgHBs). Mis à part l'entrée et l'assemblage, le cycle répliquatif du VHD semble être indépendant de celui du VHB.(5)



**Figure 2. Représentation schématique en 12 étapes de la réplication du virus de l'hépatite delta dans l'hépatocyte.** On peut la résumer par une réplication intra-nucléaire d'un virus ARN de polarité négative. Pour la clarté du schéma, la réplication du VHB n'est pas représentée (sauf le bourgeonnement final). (17)



**Figure 3. Les différents ARN VHD dans la cellule hépatique (4)**

**A)** Le génome dans sa forme simple brin circulaire pseudo-bicaténaire où 70 % des ribonucléotides s'apparient entre eux pour former une structure linéaire non branchée.

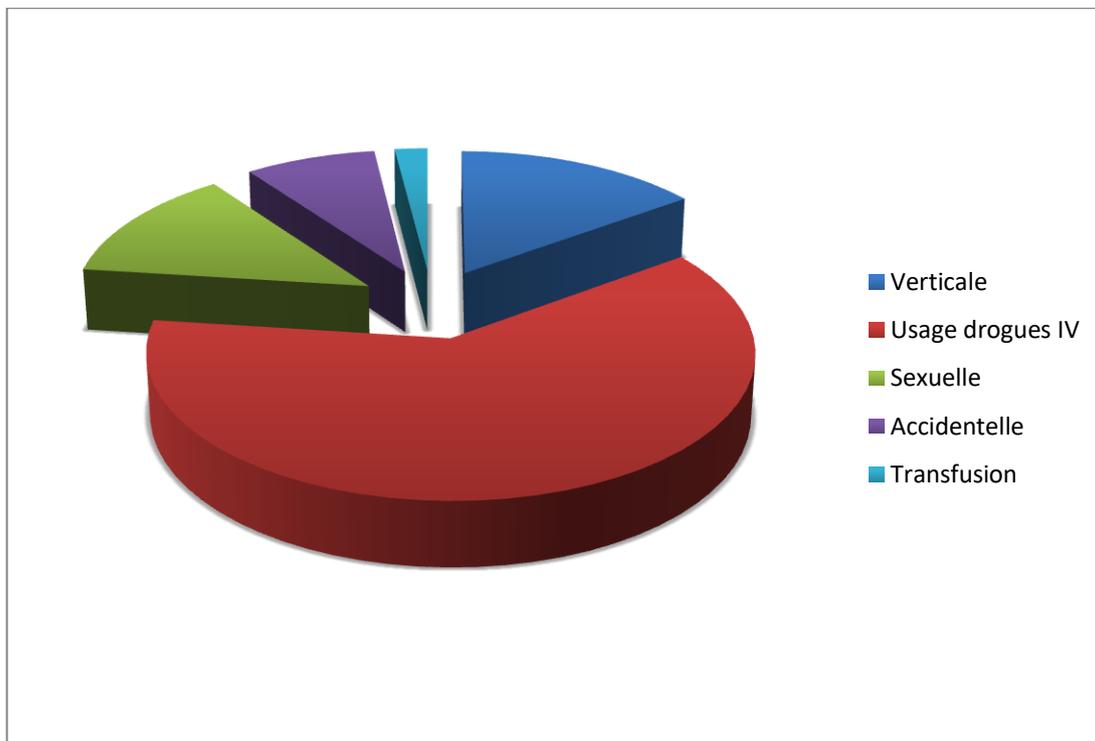
**B)** L'antigénome, complémentaire strict du génome, possède le cadre ouvert de lecture (ORF) codant les 2 isoformes de la protéine delta (S-HDAg et L-HDAg). C'est sur cette molécule AG que survient l'édition du codon stop de l'ORF S-HDAg. Le rectangle rouge représente la petite phase 3' supplémentaire de L-HDAg après l'édition du codon stop (UAG) en codon 196 tryptophane (UGG).

**C)** L'ARN messenger codant initialement la petite protéine S-HDAg puis, après édition, la grande protéine L-HDAg qui comprend toute la phase codante de la petite protéine S-HDAg ainsi que la traduction de la petite phase codante représentée en rouge. (4)

## **I.2. Le rôle pathogène du VHD**

### **I.2.1. Transmission**

La transmission du VHD se fait préférentiellement par voie parentérale. Dans les régions à faible endémicité (comme l'Europe), la transmission est principalement due à un contact avec du sang infecté, et est donc très souvent associée à l'utilisation de drogues par voie intraveineuse. L'analyse des facteurs de risque potentiels d'infection par le VHD confirme que les toxicomanes par voie parentérale sont les plus exposés et jouent un rôle majeur dans la propagation du VHD dans le monde occidental. (19) La transmission par voie sexuelle ainsi qu'intrafamiliale sont plus importantes proportionnellement dans les régions à forte endémicité, et en contexte social plus démunis. (20)



**Figure 4. Modes de transmission du VHD (21)**

## **I.2.2. Présentation clinique et progression**

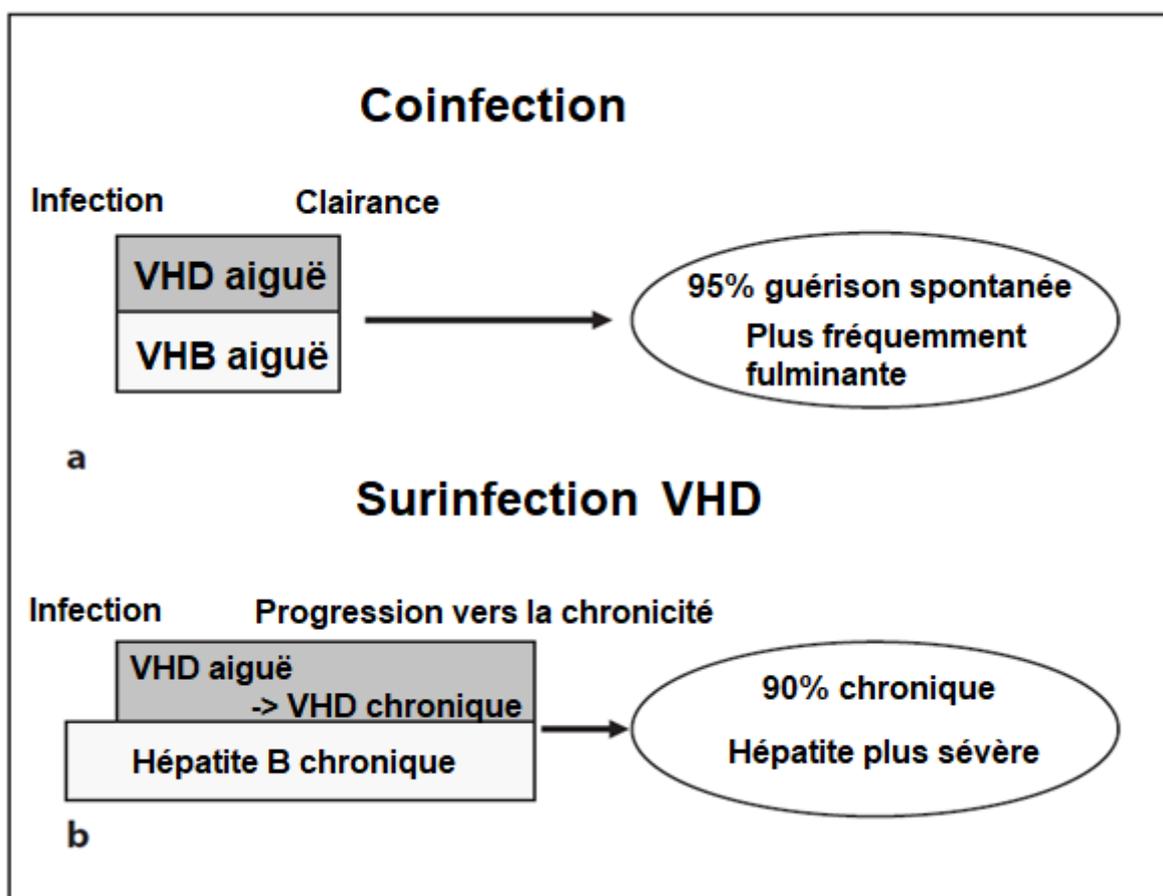
L'expression clinique de l'hépatite D aiguë est différente selon la modalité d'acquisition du VHD. Depuis les premières études, le VHD s'est révélé être un virus hautement pathogène responsable des formes les plus graves d'hépatite aiguë, notamment l'hépatite fulminante, et d'hépatite chronique chez les personnes positives pour l'AgHBs. L'interaction du VHD avec d'autres virus des hépatites ou le virus de l'immunodéficience humaine est complexe et peut conduire à des profils différents en termes d'expression virologique et de réponses immunologiques. Les infections virales multiples sont associées à la progression rapide vers le carcinome hépatocellulaire par fibrose hépatique. (22)

### ***1.2.2.1. VHB coinfection/surinfection histoire naturelle***

On distingue deux situations d'infection par le VHD, soit une infection simultanée avec le VHB (coinfection), soit une surinfection d'une hépatite chronique B préexistante. Il est important de distinguer ces deux entités, le pronostic étant très différent.

La coinfection peut se présenter sous forme d'une hépatite aiguë monophasique ou biphasique (VHB puis VHD) et aboutit souvent à une maladie autolimitée avec séroclairance des deux virus (seulement 2 % de passage à la chronicité).(23) Une coinfection simultanée VHB/VHD peut conduire à une hépatite fulminante, mais 95% des cas se remettent spontanément (**Figure 5**) (24).

A l'opposé, la surinfection conduit fréquemment à une hépatite chronique active (dans plus de 90 % des cas) et la clairance spontanée de l'infection est extrêmement rare. (23) Dans les deux cas, l'hépatite aiguë a tendance à être plus sévère et plus fréquemment fulminante (dans plus de 17 % des cas), qu'en cas d'infection par le VHB seul.(22) Une prévalence sérologique d'anti-VHD de 9,6% a été constatée chez les sujets ayant eu auparavant une infection par le VHB. (7)



**Figure 5. Comparaison schématique de l'évolution de la coinfection VHB / VHD (a) et de la surinfection (b) d'un patient VHB avec VHD (24)**

### **L'hépatite Delta aiguë :**

L'hépatite D aiguë peut cliniquement aller de l'hépatite légère à l'hépatite fulminante entraînant le décès. La trajectoire variable peut être le reflet de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte ou du niveau d'assistance par le VHB : plus importante est la propagation du VHB vers les hépatocytes, plus grave la coinfection sera. Dans la plupart des cas, l'hépatite Delta aiguë ressemble à une hépatite spontanément résolutive typique qui ne peut pas être distinguée cliniquement et histologiquement de l'hépatite B ou d'autres types d'hépatites virales aiguës. (25)

Les symptômes cliniques de l'hépatite D aiguë ne peuvent pas être distingués de ceux signalés pour d'autres formes d'hépatite virale, bien qu'ils aient tendance à être plus graves. Après une période d'incubation de 3 à 7 semaines, caractérisée par une réplication active du VHD, des symptômes cliniques non spécifiques tels que la fatigue, l'anorexie, la léthargie et les nausées commencent avec des signes biochimiques d'hépatite. Il y a une augmentation spectaculaire des activités sériques de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT) concomitante avec une diminution de la réplication virale. Cette phase peut être suivie d'une phase ictérique avec persistance des nausées et fatigue, avec augmentation de la bilirubinémie. La surinfection par le VHD peut être associée à une hépatite fulminante, induisant une insuffisance hépatique aiguë, au cours de laquelle la perte soudaine d'hépatocytes conduit à une défaillance de multiples organes chez un sujet sans maladie hépatique antérieure. Plus de la moitié des cas d'insuffisance hépatique aiguë chez les sujets AgHBs positifs sont dus au VHD plutôt qu'au VHB seul. (22)

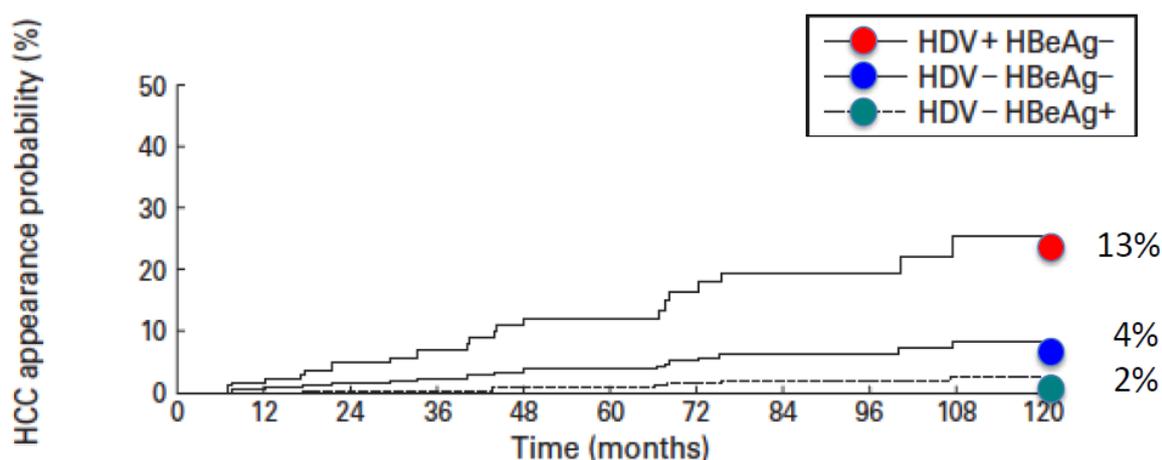
### **L'hépatite Delta chronique :**

C'est la forme d'hépatite virale chronique la moins répandue, la plus sévère et la plus rapidement évolutive à tous les âges. Chez 15% des patients, la cirrhose se développe entre 1 et 2 ans après le début de l'hépatite D aiguë. Le risque de développer une cirrhose est trois fois plus élevé chez les patients infectés par le VHD par rapport à ceux atteints du VHB seul.(22) La forme chronique de l'hépatite Delta est le plus souvent le résultat de la surinfection par le VHD chez un patient présentant une infection par le VHB, mais certains cas peu fréquents de coinfection VHB-VHD peuvent également évoluer en hépatite chronique. Ces deux formes ne peuvent pas être différenciées sur des bases cliniques ou morphologiques. (25) La présentation clinique est très variable car l'hépatite Delta chronique peut être découverte accidentellement, ou peut être associée à des symptômes tels que fatigue, malaise et anorexie. Une fois que la cirrhose se développe, la maladie peut être stable et asymptomatique ou présenter des complications liées à une cirrhose avancée conduisant à une insuffisance hépatique. (22)

La caractéristique la plus importante est l'évolution rapide de l'hépatite Delta chronique vers la cirrhose. L'infection concomitante par le VHD est associée à un risque multiplié par trois d'évolution vers le carcinome hépatocellulaire (CHC) et à un risque de mortalité doublé, confirmant le mauvais pronostic pour les patients atteints de cirrhose compensée.(19)

### Facteurs corrélés au CHC (carcinome hépatocellulaire) :

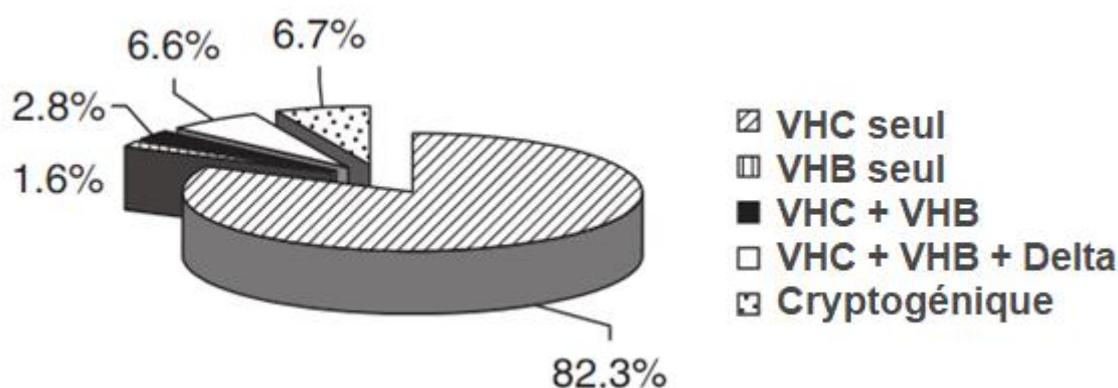
L'impact de l'infection à VHD sur l'évolution clinique de la cirrhose compensée de type B a été analysé dans une cohorte de 200 patients non traités suivis pendant une période médiane de 6,6 ans. Parmi les caractéristiques cliniques et biochimiques étudiées, l'âge, les taux bas de plaquettes et une concentration élevée de bilirubine ont été significativement associés au risque de CHC. La surinfection à VHD augmente le risque de CHC d'un facteur de 3,2. Le risque de survenue d'un CHC estimé après ajustement complet sur cinq ans a été estimé maximal, de 13%, pour les cirrhotiques anti-VHD positifs / AgHBe négatifs. (**Figure 6**)(19)



**Figure 6. Probabilité cumulée d'apparition d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) chez les patients présentant une cirrhose de type B compensée (Child A) en relation avec le statut du VHD et de l'AgHBe (19)**

### 1.2.2.2. Coinfection VIH/VHC

Certaines études ont été réalisées pour évaluer l'infection VHD dans le contexte d'une infection par le VIH ou le VHC, le VHD représentant généralement la pire situation. (24) Un groupe espagnol a constaté chez les patients infectés par le VIH que le taux de cirrhose était le plus élevé parmi ceux qui présentaient une triple infection VHB-VHC-VHD par opposition à une coinfection par le VIH-VHC ou par le VHB seul. (**Figure 7**) (26) Les infections multiples aggravent les lésions hépatiques, et notamment la fibrose. Le score de fibrose était significativement plus élevé chez les patients atteints de triple infection que chez les patients appariés infectés seulement par le VHC. La triple infection est généralement associée à une maladie hépatique avancée et au CHC, mais des études prospectives à long terme sont encore nécessaires. (22)



**Figure 7. Les étiologies de la cirrhose dans une population de patients infectés par le VIH (26)**

## II. Épidémiologie des infections VHD

### II.1. Dans le monde

L'infection par le VHD est une maladie ayant un impact significatif sur la santé mondiale et encore largement sous-estimée. (24) Bien que le VHD ait été identifié il y a seulement 40 ans, il est probablement présent chez l'homme depuis longtemps.

L'infection par le VHD est répandue dans le monde entier, mais pas de manière uniforme.(27) Les études récentes conduites dans différents pays d'Europe, aux États-Unis, en Australie, en Afrique, au Moyen-Orient et en Asie ont montré une prévalence de l'infection Delta (définie par le taux de portage des anticorps anti-VHD chez les patients VHB positifs) plus importante que prévue.(28) Des régions endémiques pour l'hépatite Delta ont été décrites en Afrique de l'Ouest et dans le bassin de l'Amazone (avec des prévalences allant jusqu'à 85 % des porteurs du VHB). La région méditerranéenne est considérée comme étant de prévalence intermédiaire, alors que l'Europe de l'Ouest et du Nord, ainsi que l'Amérique du Nord sont considérées comme des régions à faible endémicité. (5)

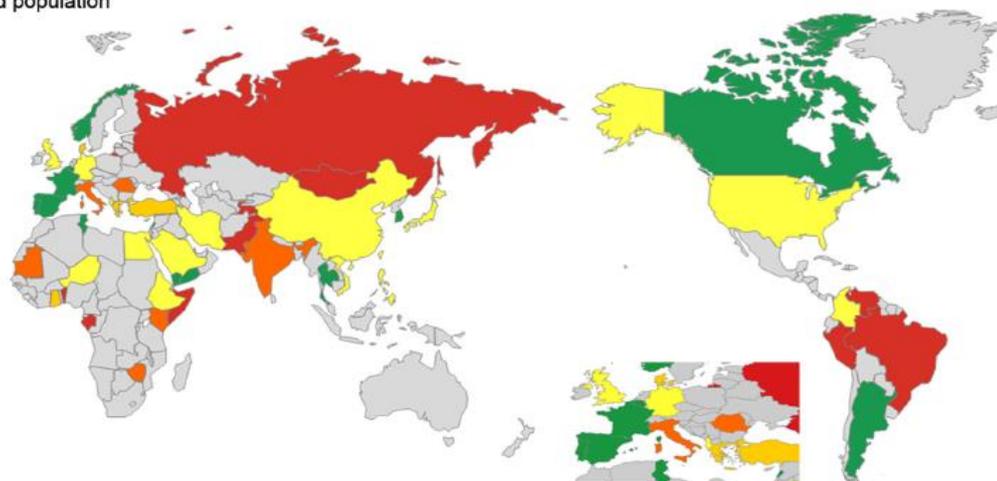
La prévalence mondiale de l'infection par le VHD est d'environ 62 à 72 millions d'individus. Dans la population AgHBs-positif, estimée à 240 millions d'individus(29), la prévalence de la coinfection VHB-VHD a été évaluée à 14,57% : 10,58% dans une population sans facteurs de risque (l'utilisation de drogues intraveineuses-IDVU et comportement sexuel à haut risque-HRSB) ; 37,57% dans la population d>IDVU et 17,01% dans la population de HRSB (**Figure 8**). (30) Donc, l'épidémie actuelle est principalement due à l'injection de drogues illicites, avec une séroprévalence du VHD trois fois plus élevée dans la population qui consomme des drogues par voie intraveineuse que dans la population générale.

L'épidémiologie de l'infection par le VHD n'est encore que partiellement comprise. Même sur un territoire, des "points chauds" inexpliqués peuvent exister.(31) Dans le bassin amazonien, 60% à 100% des individus peuvent être positifs dans des villages distincts, tandis que le VHD peut ne pas du tout être détecté dans les zones de peuplement voisines.(20)

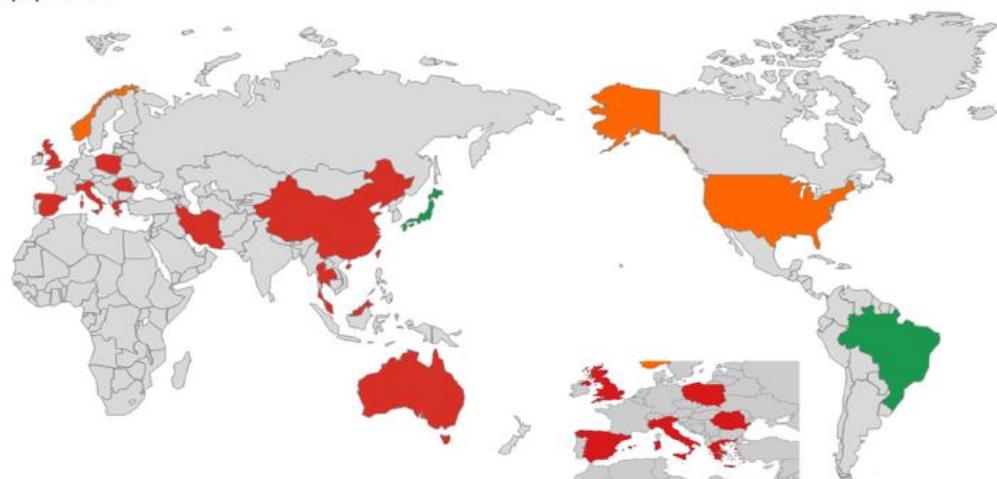
Malgré la disponibilité des vaccins contre l'hépatite B, la prévalence du VHD a augmenté au cours des 20 dernières années dans plusieurs pays en raison des migrations de populations.(31) Cependant, la prévalence réelle de l'infection peut être sous-estimée du fait d'un défaut de screening systématique des patients infectés par VHB, ainsi que de

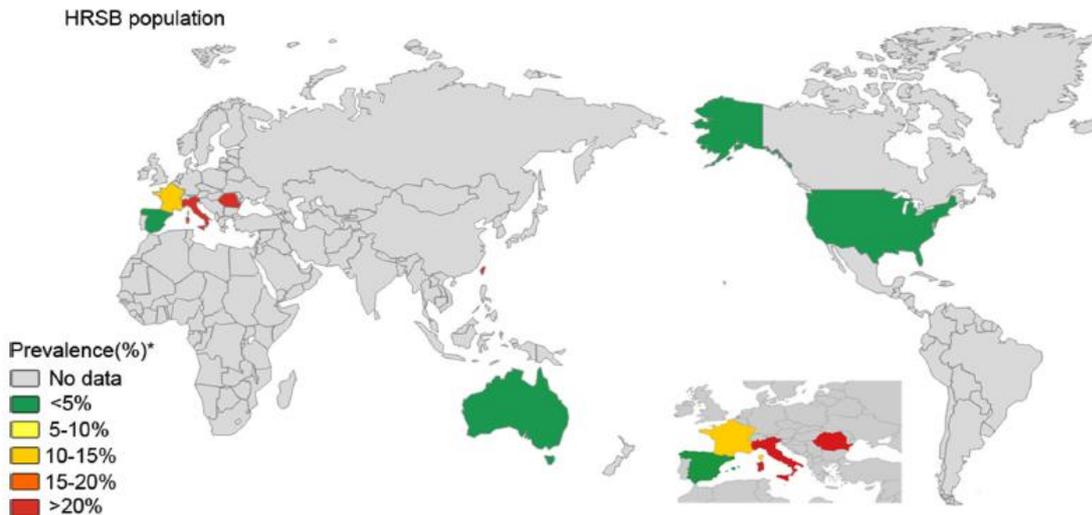
l'absence d'outils diagnostiques standardisés.(5) En dépit de données manquantes dans de nombreuses régions du monde endémiques pour le VHB, et malgré des campagnes de vaccination anti-VHB conduites dans plusieurs pays, l'infection par le VHD est loin d'être une maladie en voie de disparition. (28)

Mixed population



IVDU population





**Figure 8. Séroprévalence du VHD parmi trois populations positives pour l'AgHBs (30)**  
 HRSB - comportement sexuel à haut risque ; IVDU - utilisation de drogues intraveineuses

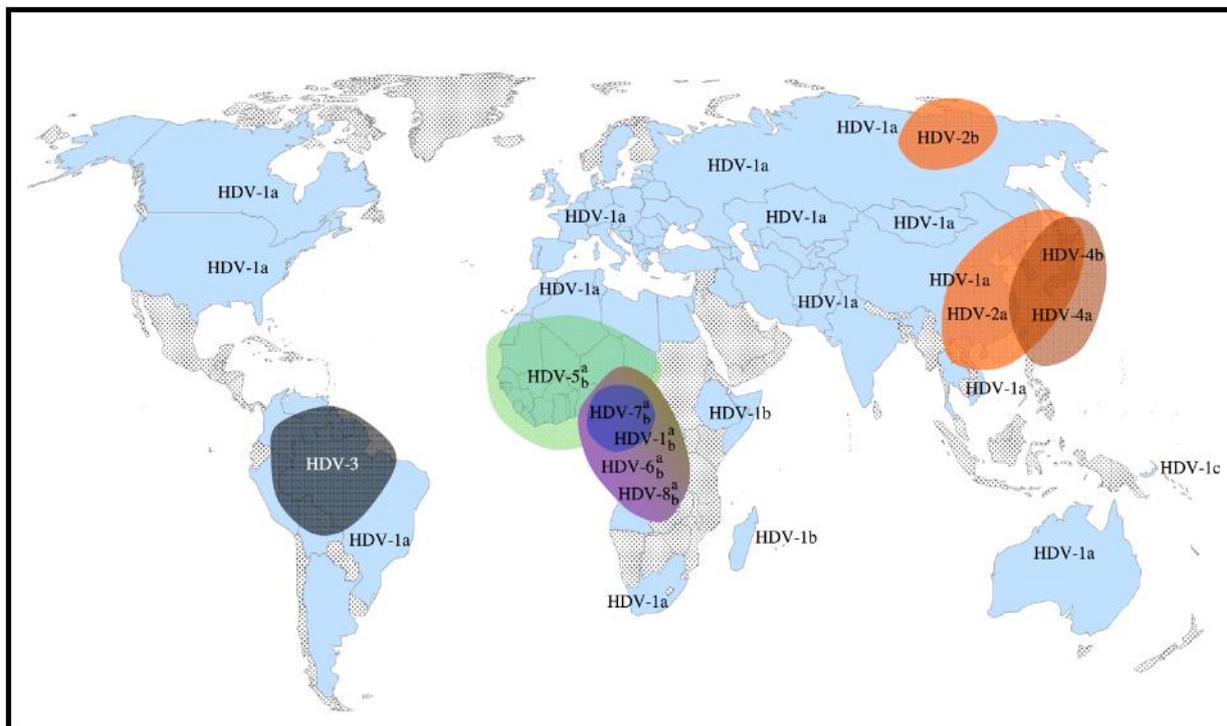
### Variabilité génétique du VHD :

Le virus présente une grande variabilité génétique, notamment en Afrique, en Amazonie et en Asie. Actuellement, le genre Deltavirus comprend huit génotypes, appelés VHD-1 à VHD-8. VHD-1 est omniprésent alors que VHD-2 et VHD-4 en Asie et VHD-3 en Amazonie sont géographiquement restreints. (32) VHD-5 ± VHD-8 ont une origine africaine claire, mais peuvent être trouvés ailleurs, en raison du commerce des esclaves et des migrations humaines. (33)

La gravité des infections à VHB ± VHD peut être due à des combinaisons évolutives et / ou géographiques particulières de génotypes de VHB ± VHD, et certaines associations peuvent être plus pathogènes que d'autres. Au milieu des années 80, des cas d'insuffisance hépatique aiguë sévère à Bangui, en République centrafricaine (RCA), ont été associés à une épidémie de VHD. Au moins 124 cas d'hépatite fulminante sont survenus sur 154 cas d'ictère à l'hôpital universitaire de Bangui et 88% des patients sont décédés. (32)

L'émergence de nouveaux génotypes du VHD en Europe met en évidence les défis à venir. (30) Grâce au typage prospectif en France de toute nouvelle souche VHD qui réplique et grâce à de nombreuses études réalisées dans diverses régions du monde (Algérie, Centrafrique, Mauritanie, Niger, Roumanie, Tunisie, Turquie), le CNR Associé a caractérisé plus de 2500 séquences VHD et mis en évidence un nouveau degré de variabilité du virus au sein de la plupart des différents génotypes : les sous-génotypes. (Rapport CNR des Hépatites B, C et Delta 2016) (**Figure 9**). La variabilité peut atteindre 40% sur toute la séquence. Cette diversité peut être générée par la sélection de variants

viraux sous la pression immunologique de l'hôte au cours d'une infection chronique et / ou par de possibles événements d'édition pouvant se produire sur différents sites.(34)



**Figure 9. Répartition mondiale des génotypes et sous génotypes VHD**

(Le Gal F., et collaborateurs - article cité dans le Rapport CNR des Hépatites B, C et Delta 2016)

L'une des questions concrètes directes posée en pratique clinique par cette grande variabilité virale, est celle des outils diagnostiques de mesure de la charge virale ARN pour le suivi des patients infectés.

En prenant en compte cette variabilité génétique du virus, en 2005 il a été développé la première méthode consensus de quantification de la charge virale ARN VHD par PCR en temps réel. Une surveillance sanitaire nationale et internationale des techniques "maison" et trousse commerciale proposées a été organisée, à la fois par l'étude des performances de ces kits et surtout par l'organisation de contrôles de qualité nationaux et internationaux.

La conclusion de toutes ces études est que la plupart des tests commerciaux ou des techniques "maison" sous-estimaient largement ou étaient incapables de quantifier la charge virale ARN Delta sur de nombreux échantillons cliniques. Ces échecs étaient principalement liés à cette diversité génétique, notamment sur des souches "Africaines". (Rapport CNR des Hépatites B, C et Delta 2016)

## II.2. En France

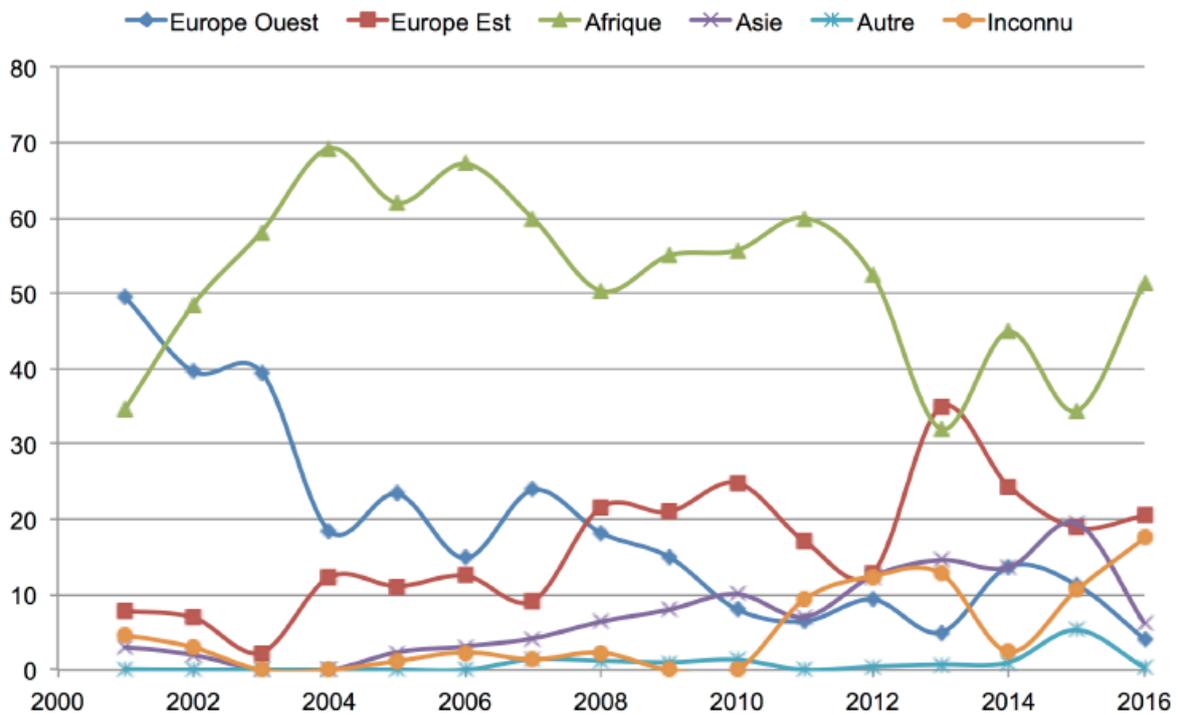
En France, la prévalence, élevée dans les années 1970–1980 a reculé dans les années 1990 avec l'avènement du vaccin contre l'hépatite B. On constate cependant une tendance à la ré-augmentation depuis le milieu des années 2010, probablement par augmentation du nombre de cas importés. Les populations les plus concernées par l'infection VHD en France sont actuellement les personnes issues de l'immigration de pays à forte prévalence, ainsi que les usagers de substances intraveineuses.(5)

Un état de la situation de l'infection par le VHD en France a été réalisé à partir d'une analyse : (1) des données de l'étude nationale réalisée par l'Institut de veille sanitaire chez les patients nouvellement pris en charge pour une hépatite B chronique entre 2008 et 2010 ; (2) d'études réalisées chez les donneurs de sang par l'Institut national de la transfusion sanguine associé au Centre national de référence (CNR) des hépatites B, C et Delta ; (3) des différentes études conduites par le CNR associé hépatite Delta et (4) des résultats préliminaires de l'étude Deltavir, réalisée chez plus de 1 000 patients ayant présenté une infection à VHD active et dont les souches virales collectées de façon prospective de 2001 à 2013 sont conservées dans la bibliothèque du CNR associé hépatite Delta.

Cette analyse montre une faible prévalence de l'infection VHD en France, avec un portage des anticorps anti-VHD chez 4% des patients VHB positifs. Ces patients sont originaires principalement de pays de forte ou de moyenne endémie. Les études indiquent la nécessité absolue d'effectuer le dépistage des anticorps anti-VHD chez tous les patients infectés par le VHB, ainsi que la quantification de la charge virale du VHD chez les patients positifs à l'aide de techniques diagnostiques prenant en compte la grande diversité génétique du VHD.(28)

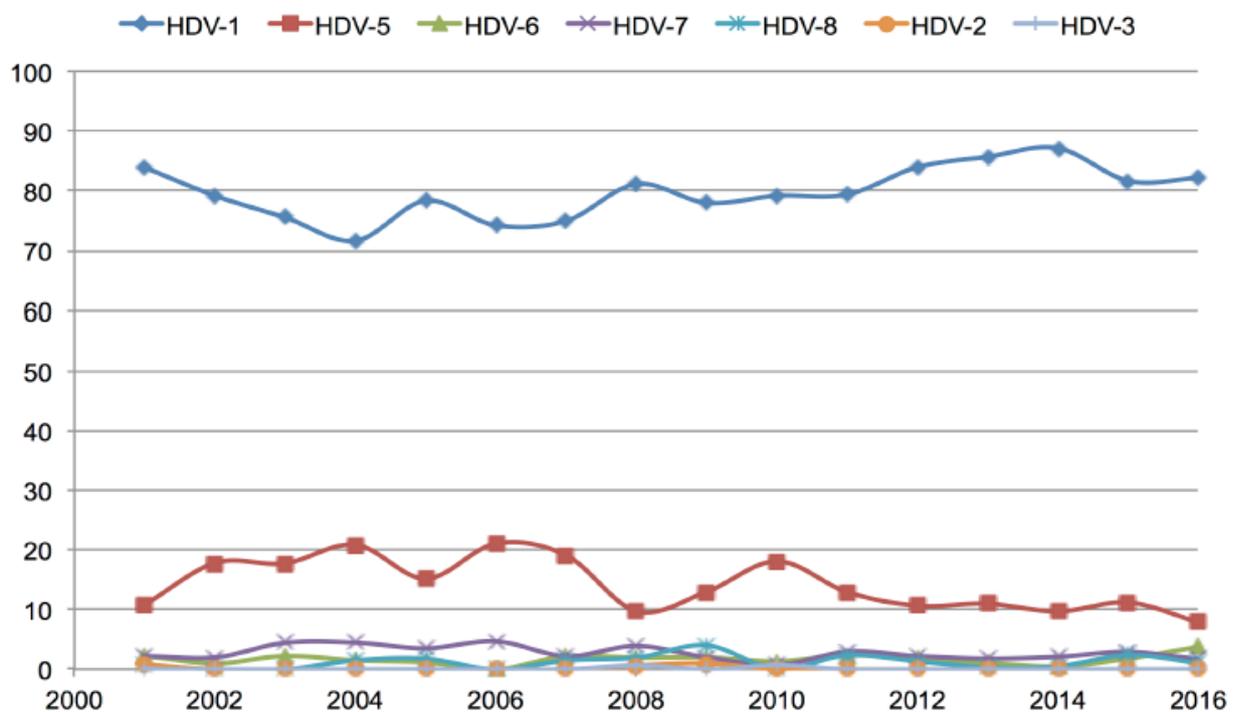
### **Typage prospectif des nouvelles souches Delta circulant en France**

En 2016, 292 nouvelles souches ont été identifiées et génotypées. Les génotypes se répartissent comme suit : 195 HDV-1 dont 152 HDV-1 africains et 87 HDV-1 européens ou asiatiques ; 23 HDV-5, 11 HDV-6, 5 HDV-7 et 3 HDV-8. Dix souches sont en cours de caractérisation (voir figures et tableau ci-dessous). (Rapport CNR des Hépatites B, C et Delta 2016)



**Figure 10. Origine géographique des patients VHD positifs en France (en %)**

(Rapport CNR des Hépatites B, C et Delta 2016)



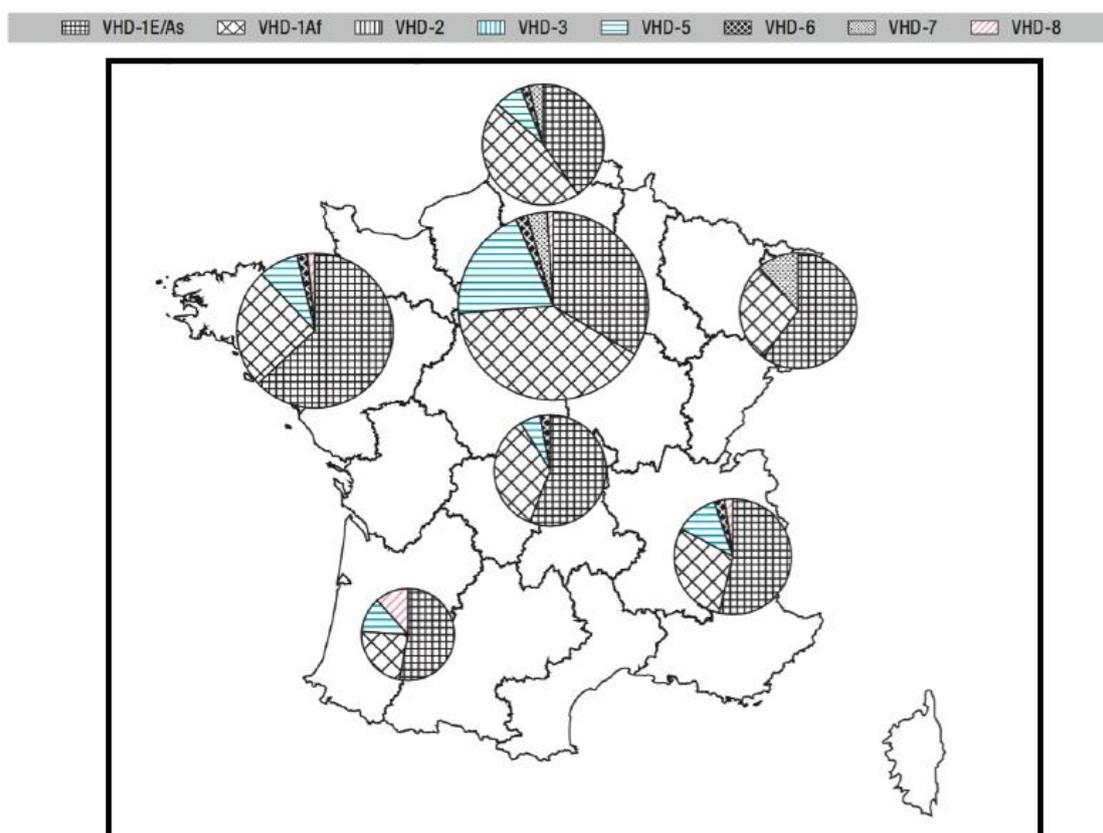
**Figure 11. Proportion (%) des différents génotypes VHD caractérisés en France**

(Rapport CNR des Hépatites B, C et Delta 2016)

HDV génotypes	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
HDV-1	110	80	34	48	134	95	102	125	78	118	135	189	241	170	138	240	1379
HDV-5	14	18	8	14	26	27	26	15	13	27	22	24	31	19	19	23	251
HDV-6	3	1	1	1	2	0	3	3	2	2	4	4	3	1	3	11	26
HDV-7	3	2	2	3	6	6	3	6	2	1	5	5	5	4	5	5	46
HDV-8	1	0	0	1	3	0	2	3	4	0	4	3	1	1	4	3	21
HDV-2	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
HDV-3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
<b>Total</b>	<b>131</b>	<b>101</b>	<b>45</b>	<b>67</b>	<b>171</b>	<b>128</b>	<b>136</b>	<b>154</b>	<b>100</b>	<b>149</b>	<b>170</b>	<b>225</b>	<b>281</b>	<b>195</b>	<b>169</b>	<b>282</b>	<b>1727</b>

**Tableau 1. Génotypes des nouvelles souches Delta caractérisées en France depuis 2001**

(Rapport CNR des Hépatites B, C et Delta 2016)



**Figure 12. Répartition des génotypes et sous génotypes en France**

(Rapport CNR des Hépatites B, C et Delta 2016)

## III. Méthodes diagnostiques

### III.1. Identification de l'infection par VHD

Le screening du VHD de tous les patients infectés par le VHB (y compris les porteurs « asymptomatiques ») doit être réalisé au moins une fois dans l'histoire de la maladie, idéalement au moment du diagnostic d'hépatite B mais aussi en cas d'aggravation de celle-ci (en cas d'exacerbation aiguë, d'aggravation de la progression de l'hépatite chronique ou de décompensation de cirrhose). Le diagnostic initial doit être sérologique et est basé, en plus des marqueurs sérologiques de l'hépatite B, sur la détection des anticorps anti-VHD totaux (IgG et IgM anti-VHD), qui apparaissent tôt dans la phase aiguë de l'infection et persistent tout le long de la maladie, comme représenté dans la **Figure 13**.(5)

#### III.1.1. Marqueurs sérologiques

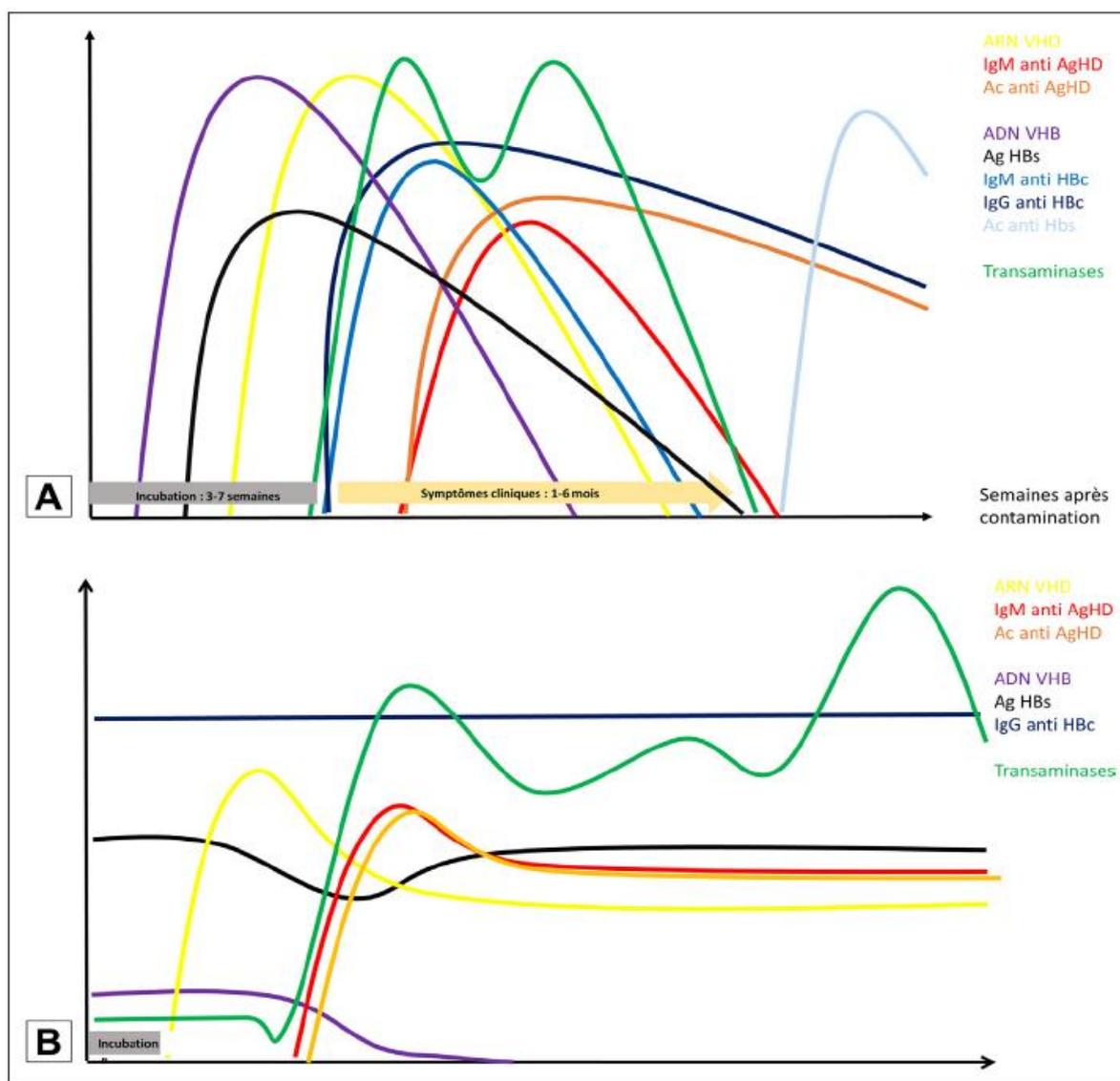
Il existe peu de troupes diagnostiques pour le diagnostic du VHD. Trois marqueurs sont proposés : l'antigène Delta, les anticorps IgM anti-VHD et les anticorps IgG anti-VHD. Les tests utilisés pour la recherche des marqueurs directs (l'antigène Delta) et indirects (les anticorps anti-VHD) sont fondés sur des techniques immuno-enzymatiques de type ELISA en microplaque.

La détection des anticorps anti-VHD signe un contact avec le VHD. Les anticorps persistent quelle que soit l'issue de l'infection : guérison ou chronicité. Dans un contexte d'hépatite B aiguë (IgM anti-HBc positives), la détection d'anticorps anti-VHD confortée éventuellement par la détection d'IgM anti-VHD est compatible avec une coinfection par les deux virus. Dans un contexte d'hépatite B chronique, la survenue d'une cytolyse avec apparition d'anticorps anti-VHD signe une surinfection par le VHD. (Référentiel en microbiologie médicale 5<sup>ème</sup> édition 2015) En cas de négativité, on peut parler d'absence d'infection Delta. Toutefois, en cas de persistance des signes cliniques en l'absence d'autres causes évidentes, ceux-ci peuvent être contrôlés avec un délai d'une semaine à quinze jours.(28)

L'une des spécificités du VHD est que les anticorps IgM anti-VHD persistent au cours de l'infection chronique. Les IgM anti-VHD peuvent manquer chez des patients africains ayant pourtant une répllication virale active attestée par une charge virale ARN positive. Dans certaines études, leur présence, même en cas de charge virale ARN négative, est une contre-indication à l'arrêt des traitements et, de ce fait, la détection des IgM peut avoir un intérêt dans la prise en charge des patients. (28) Par contre, les IgM anti-

VHD peuvent persister et fluctuer au cours du portage chronique de l'infection par VHD limitant leur intérêt en pratique. (35) Plusieurs études cliniques ont montré que les anticorps IgM anti-VHD manquent chez près de 24,6% des patients ARN VHD positifs. Il reste à élucider si cela est ou non dû à un manque de sensibilité des tests ou à la souche virale. (36)

L'antigène delta n'est détectable dans le sérum que de manière irrégulière, pendant la phase aiguë ou en cas d'immunodépression, et sa recherche n'est donc pas utile pour le diagnostic. (5)



**Figure 13. Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques lors d'une infection par le VHB et le VHD (5)**

**A. Co-infection :** Après une période d'incubation de durée variable (3– 7 semaines), on observe une hépatite biphasique : apparition premièrement de la charge virale VHB et de

l'Ag HBs, puis de la charge virale VHD. On remarque la phase symptomatique, dont la traduction biologique est l'apparition des Ac anti-HBc puis anti-VHD, accompagnés de manière parallèle de deux pics de cytolyse. Les Ac anti-HBs sont les derniers à apparaître et signent la guérison sérologique.

**B. Surinfection :** Après une incubation plus courte, on voit apparaître l'ARN du VHD, puis les Ac anti-VHD avec de manière concomitante une cytolyse importante, qui fluctue mais persiste. Le VHB est quant à lui réprimé, et la charge virale diminue, voire disparaît. L'Ag HBs, nécessaire à la formation des virions VHD complets reste très présent. Cette forme d'infection conduit dans la plupart des cas à une infection chronique. (5)

Par ailleurs, plusieurs équipes ont montré un intérêt de l'étude de la cinétique de quantification de l'antigène HBs dans le suivi des patients infectés. La diminution de l'antigène HBs serait un marqueur pronostique favorable de la résolution de l'infection VHB/VHD. (28)

Donc, en parallèle de l'évaluation de l'infection par le VHD, les marqueurs d'infection par le VHB doivent être évalués extensivement. En présence d'un AgHBs positif, la détection de l'AgHBe et de l'Ac anti-HBe, ainsi que des Ac anti-HBc (IgM et IgG) et la virémie du VHB doivent être déterminés, non seulement parce que le profil de l'hépatite B aura des implications thérapeutiques importantes, mais aussi parce que lors d'une hépatite Delta aiguë, les marqueurs sérologiques du VHD ne permettent pas la distinction entre une coinfection et une surinfection. Celle-ci est donc basée sur la recherche des anticorps anti-HBc de type IgM, qui seront présents en cas de coinfection (associée à une hépatite B aiguë) et négatifs en cas de surinfection d'un porteur chronique de VHB. (5)

### III.1.2. Marqueurs moléculaires

La recherche de l'ARN Delta avec, surtout, la quantification de la charge virale ARN par qRT-PCR en temps réel, est l'examen maître pour le diagnostic et la prise en charge des patients. La présence d'ARN Delta permet non seulement de confirmer le caractère répliatif de l'infection, mais aussi de mesurer l'efficacité du traitement institué. (28)

Un résultat négatif pour les anticorps anti-VHD ne justifie pas le dépistage de l'ARN du VHD car, jusqu'à présent, il semble que chaque individu infecté par le VHD développe des anticorps anti-VHD. (27) En revanche, en cas de sérologie positive, le diagnostic doit être complété idéalement par la quantification de la charge virale ARN du VHD, qui confirmera l'existence d'une infection active.(5) Passée la phase aiguë, la persistance d'une répliation virale évoque un portage chronique du VHD. Généralement, la

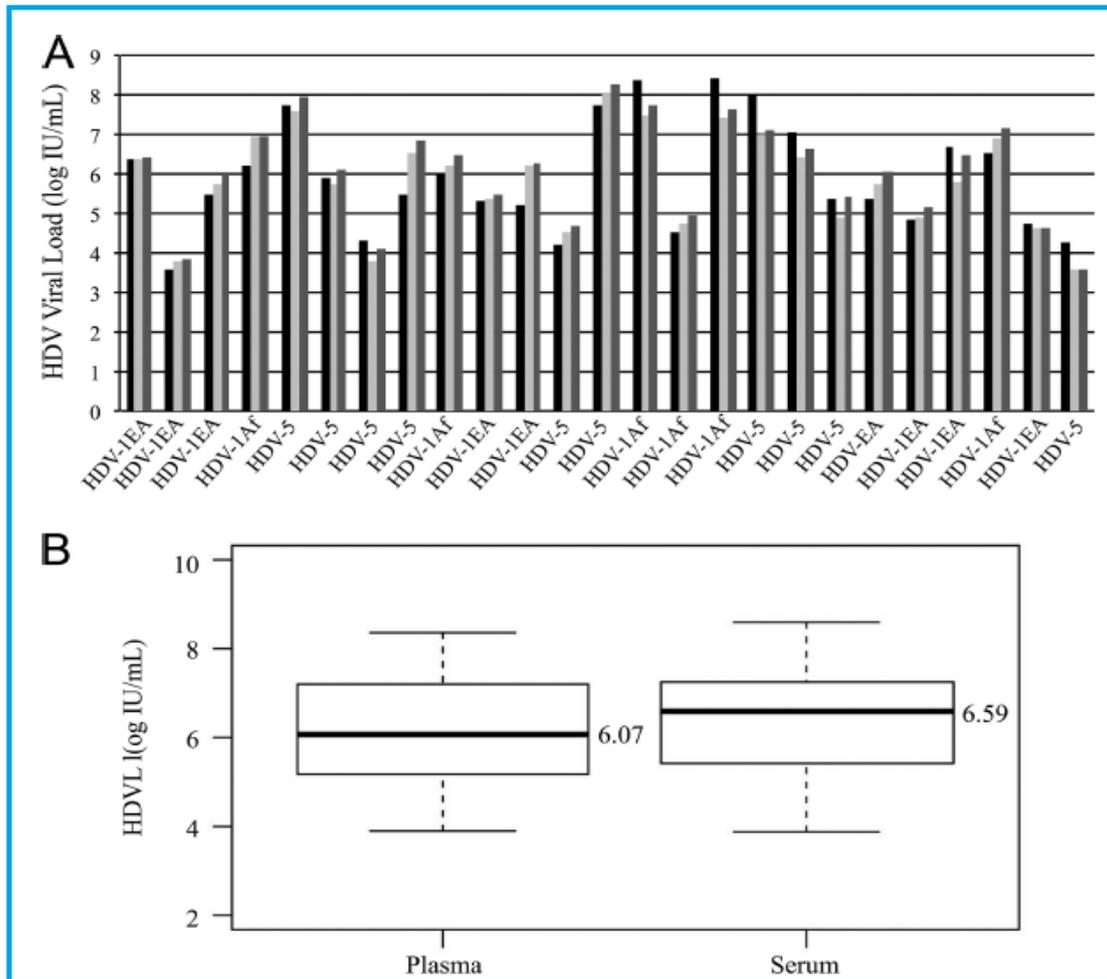
réplication du VHD tend à moduler le niveau de réplication du VHB et il est rare d'observer des réplifications importantes concomitantes des deux virus. La présence d'anticorps anti-VHD sans réplication virale confirmée à plusieurs reprises chez un porteur chronique du VHB signe une hépatite Delta guérie. (Référentiel en microbiologie médicale 5<sup>ème</sup> édition 2015)

**Techniques de quantification : optimisation et implantation en France et dans diverses régions du monde.** La validation récente d'un coffret de quantification de l'ARN delta de la société Eurobio marqué CE constitue une avancée majeure dans ce domaine, à l'ère de l'avènement des nouvelles thérapeutiques anti-VHD. Ce coffret est utilisé en routine par le CNR associé Delta. (Rapport CNR des Hépatites B, C et Delta 2016)

Le **coffret EurobioPlex Hépatite Delta** est un test d'amplification par RT-PCR en temps réel de l'ARN du virus de l'hépatite Delta conçu pour la détection qualitative et/ou quantitative à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum. Le test est indiqué pour déterminer le niveau de la charge virale chez les patients au cours de l'histoire naturelle de la maladie ou sous traitement, et le caractère réplcatif ou non de l'infection Delta. Le test n'est pas destiné au dépistage en banque ou d'organes pour le VHD. (Mode d'emploi coffret EurobioPlex VHD qRT-PCR)

Pour l'évaluation de la performance du coffret EurobioPlex Hépatite Delta, un total de 611 échantillons cliniques ainsi que des dilutions de l'étalon international (IS) VHD de l'OMS ont été pris en compte. Tous les échantillons conservés à -80°C ont été sélectionnés dans la biobanque du Laboratoire National de Référence pour le VHD (VHD FNRL). Les résultats de l'étude ont montré 100 % d'efficacité, une excellente spécificité (100%), une bonne stabilité et reproductibilité et une quantification linéaire.

Un point intéressant est que le coffret a donné des résultats comparables avec le sérum et le plasma, pour les échantillons de sérum / plasma appariés de 25 patients infectés par les souches VHD-1 et VHD-5. Les valeurs médianes de la charge virale du VHD étaient de 6,07 et 6,59 log UI/ml pour le plasma et, le sérum respectivement avec le coffret EurobioPlex Hépatite Delta, comparés à une valeur médiane attendue de 5,49 log UI/ml, selon les résultats du test VHD FNRL sur des échantillons du plasma (**Figure 14**). (37)



**Figure 14. Comparaison des charges virales VHD dans le sérum et dans le plasma (35)**

- A.** Les histogrammes représentent les charges virales VHD obtenues pour 25 paires d'échantillons de sérum et de plasma de différents génotypes et de différentes valeurs des charges virales VHD. Les valeurs obtenues avec le test FNRL sur des échantillons de plasma sont indiquées en noir; les valeurs obtenues sur des échantillons de plasma et de sérum avec le coffret EurobioPlex VHD sont indiquées en gris clair et gris foncé.
- B.** Distribution des valeurs médianes des charges virales VHD (en log UI/ml) obtenues avec le coffret EurobioPlex VHD pour les 25 paires d'échantillons de plasma et de sérum.

### III.1.3. Modèles de domination virale

La coinfection et la surinfection par le VHD inhibent la réplication du VHB chez les patients. Environ 70 à 90% des patients coinfectés par le VHD sont négatifs pour l'AgHBe et la plupart ont un faible taux d'ADN du VHB. Si l'infection à VHD est éliminée spontanément ou après traitement par PEG-IFN, la réplication du VHB peut être réactivée.

De nombreux patients atteints par le VHB et par le VHD présentent des signes sérologiques d'exposition au VHC - environ 30% dans les cohortes européennes. Chez les patients présentant une triple infection, le VHD est le virus dominant, car il inhibe non seulement la réplication du VHB, mais également la réplication du VHC. La plupart des patients dont l'ARN du VHC est négatif sont probablement guéris de l'infection à VHC, mais d'autres études de suivi à long terme sont nécessaires, en particulier parce que les modèles de dominance virale évoluent avec le temps dans les coinfections à VHB et VHC. (38)

<b>Anticorps IgG anti-VHD</b>	Positifs chez toutes les personnes exposées au VHD. Persistent à long terme, même après la clairance virale.
<b>Anticorps IgM anti-VHD</b>	Positifs dans l'infection aiguë. Persistent chez une grande proportion de patients atteints d'une infection chronique.
<b>ARN VHD qualitatif</b>	Marqueur de réplication VHD. Positif chez tous les patients présentant une infection chronique. Négatif dans la clairance virale spontanée ou induite par le traitement.
<b>ARN VHD quantitatif</b>	Méthode utile pour prédire ou surveiller la réponse au traitement.
<b>AgHBs qualitatif</b>	Doit être positif pour l'infection à VHD.
<b>AgHBs quantitatif</b>	Positivement corrélé à l'ARN VHD.
<b>AgHBe</b>	Négatif chez environ 85% des patients; associé à anti-HBe détectable.
<b>ADN VHB quantitatif</b>	Généralement négatif ou faible car supprimé par le VHD. Peut réactiver après une clairance spontanée
<b>Transaminases</b>	Généralement augmentées mais ne sont pas corrélées à l'importance des lésions histologiques du foie.

**Tableau 2. Marqueurs diagnostiques de l'infection à VHD et leur importance (38)**

**Prélèvements :** 7 mL de sang recueillis sur tube sec sont suffisants pour établir un statut sérologique vis-à-vis du VHD. La recherche du génome viral s'effectue sur 7 mL de sang sur tube sec ou EDTA. Idéalement, le sérum ou plasma doivent être conservés à -30°C ou -80°C. (Référentiel en microbiologie médicale 5<sup>ème</sup> édition 2015)

## III.2. Évaluation de la maladie hépatique

Une fois le diagnostic d'hépatite Delta chronique établi, l'atteinte hépatique doit être évaluée pour tous les patients, afin de poser l'indication du traitement. La biopsie hépatique n'est pas nécessaire au diagnostic de l'infection par VHD, mais est encore la référence pour l'évaluation du stade et de l'activité de la maladie du foie et est réalisée dans la majorité des centres avant le début d'un traitement par PEG-IFN.(5) Des études n'ont montré aucune association entre les niveaux d'ARN du VHD, le titre d'AgHBs, les valeurs des tests hépatiques et l'évaluation histologique de la maladie hépatique, renforçant ainsi le rôle essentiel de la biopsie du foie dans la maladie hépatique liée au VHD. (38)

L'évaluation de la sévérité de la maladie hépatique doit être systématique pour diagnostiquer une cirrhose. Les méthodes non-invasives de diagnostic de la fibrose hépatique recommandées par la Haute Autorité de Santé (HAS) doivent être utilisées : mesure de l'élasticité hépatique par FibroScan ou test sanguin (FibroTest, FibroMètre, Hépascore). Même si la cirrhose est cliniquement évidente, les méthodes non-invasives de diagnostic de la fibrose hépatique ont un intérêt pronostique.(39)

Chez les patients qui ont une valeur d'élasticité hépatique < 20 kPa et un taux de plaquettes > 150 G/L, il n'est pas nécessaire de faire une endoscopie digestive haute pour rechercher des varices œsophagiennes. Il suffit de suivre ces patients par une mesure de l'élasticité hépatique et une Numération Formule Sanguine une fois par an. A travers un hémogramme on peut identifier : une thrombopénie, une neutropénie ou une anémie, le plus souvent microcytaire. En cas d'élévation de l'élasticité hépatique ou d'aggravation de la thrombopénie, une endoscopie digestive haute doit être réalisée (**Figure 15**). En cas de cirrhose, un dépistage semestriel du carcinome hépatocellulaire par échographie abdominale est indispensable. Chez les patients cirrhotiques à haut risque de CHC (comorbidités, âge > 50 ans, hypertension portale, score de Child B ou C –**Figure 16**) un examen tomodensitométrique doit être discuté, notamment si l'échographie abdominale n'est pas d'excellente qualité. (Recommandations AFEF 2017)



**Figure 15. Aspect des varices œsophagiennes en endoscopie**

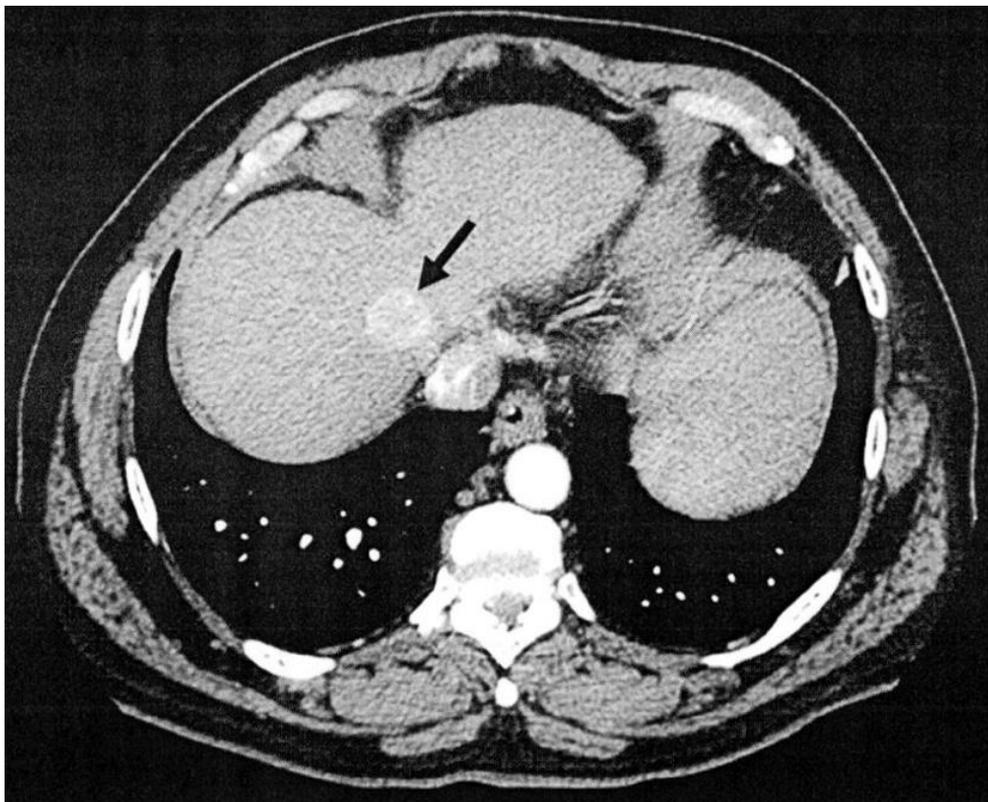
(A: absence de varices; B: petites varices de grade I; C: grosses varices de grade III) (40)

	1 point	2 points	3 points
<b>Ascite</b>	Absente	Modérée	Tendue ou réfractaire aux diurétiques
<b>Bilirubine (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	< 35	35-50	> 50
<b>Albumine (g/l)</b>	> 35	28-35	< 28
<b>INR</b>	< 1,7	1,7-2,2	> 2,2
<b>TP</b>	> 50%	40-50%	< 40%
<b>Encéphalopathie</b>	Absente	Légère à modérée (stade 1-2)	Sévère (stade 3-4)
Le pronostic de la cirrhose est établi en fonction du score total des points: <b>Child-Pugh A</b> (5-6 points): survie à 1 an de 100% <b>Child-Pugh B</b> (7-9 points): survie à 1 an de 80% <b>Child-Pugh C</b> (10-15 points): survie à 1 an de 45%			
INR: International normalized ratio; TP: taux de prothrombine.			

**Figure 16. Score de Child-Pugh**

(Scores en hépatologie : Child-Pugh, MELD et Maddrey, Rev Med Suisse 2010)

L'échographie permet de dépister des nodules de moins de 1 cm de diamètre. Le CHC se traduit habituellement par une zone hypoéchogène. Toutefois, toutes les lésions hypoéchogènes ne correspondent pas à un CHC (il peut s'agir en particulier de nodules de régénération bénins) et tous les CHC ne sont pas hypoéchogènes. En cas de doute, l'échographie doit donc être complétée par un examen tomodensitométrique (**Figure 17**) et/ou une résonance magnétique nucléaire. Les caractéristiques du CHC en imagerie sont son aspect hypervasculaire au temps artériel et hypovasculaire au temps veineux (portal) par rapport au parenchyme hépatique adjacent. Lorsque le comportement des nodules en imagerie n'est pas caractéristique, une biopsie écho-guidée peut être nécessaire. (40)



**Figure 17. Carcinome hépatocellulaire en tomodensitométrie (flèche) caractérisé par une prise de contraste au temps artériel (40)**

## **IV. Traitements**

Bien que des progrès significatifs aient été réalisés dans le traitement de l'hépatite virale Delta au cours de la dernière décennie, le ciblage du VHD reste un défi majeur en raison de la nature non conventionnelle de ce virus et de la gravité de la maladie qu'il provoque. Contrairement au VHB et au VHC, qui possèdent tous les deux des enzymes spécifiques pouvant être directement ciblées pour inhiber leur réplication, l'absence d'une polymérase spécifique du virus fait du VHD une cible thérapeutique particulièrement difficile. De plus, malgré le lien vital qui existe entre le VHD et le VHB, la réplication du VHD est totalement autonome par rapport à celle du VHB, ce qui explique pourquoi certains inhibiteurs du VHB, tels que les analogues de nucléos(t)ides qui suppriment efficacement la réplication du VHB, ont peu ou pas d'effet sur la réplication du VHD. Le seul apport essentiel du VHB au VHD est la glycoprotéine de l'enveloppe, l'AgHBs. Cependant, les inhibiteurs spécifiques du VHB ont des effets limités sur l'expression de l'AgHBs, qui est abondamment exprimé chez les porteurs chroniques de l'infection par le VHB. Par conséquent, l'AgHBs représente un partenaire moléculaire idéal pour la production soutenue de particules infectieuses du VHD. (3)

## IV.1. Traitement de l'hépatite Delta aiguë

Dans le cadre d'une hépatite delta aiguë, seules les mesures générales sont recommandées, y compris l'orientation vers la transplantation hépatique dans les cas d'hépatite fulminante. (5)

## IV.2. Traitement de l'hépatite Delta chronique

Le traitement antiviral dans le traitement de l'hépatite Delta chronique vise à diminuer la CV du VHD et prévenir les séquelles à long terme de l'hépatite Delta chronique - cirrhose, décompensation hépatique et CHC, entraînant le décès ou la nécessité d'une transplantation hépatique. (3)

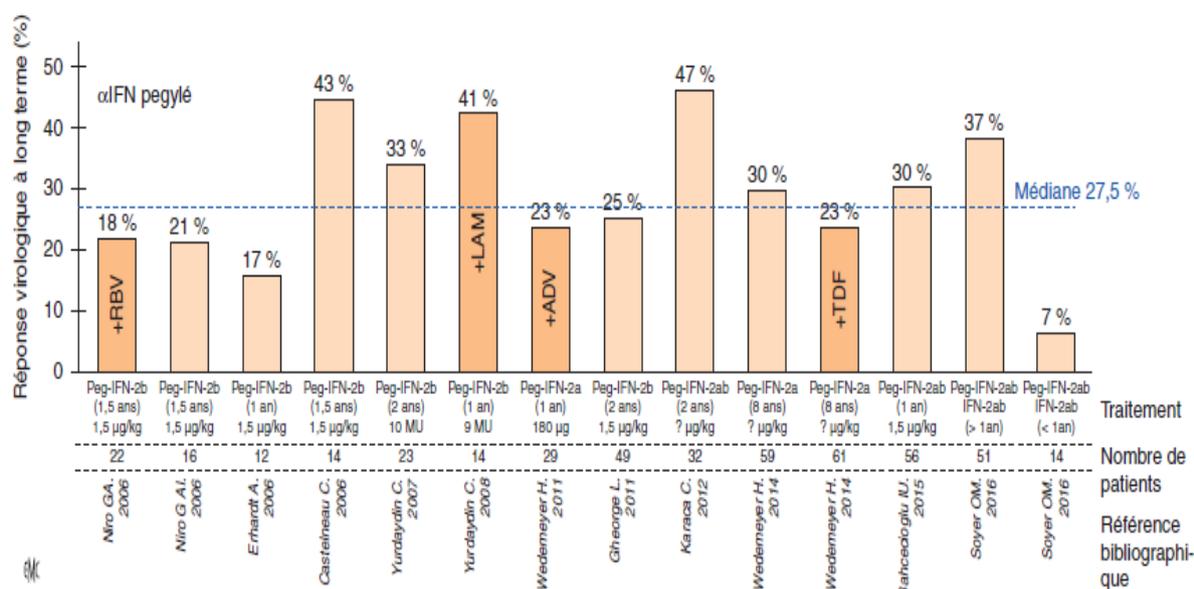
Les traitements disponibles actuellement sont : le PEG-IFN et l'inhibiteur de l'entrée virale – le Bulevirtide®, utilisé dans le cadre d'une ATU. Les inhibiteurs de l'assemblage viral et les polymères d'acides nucléiques sont en cours d'évaluation clinique.

### IV.2.1. PEG-IFN

L'IFN  $\alpha$ -2a pégylé (180  $\mu$ g par semaine) ou l'IFN  $\alpha$ -2b pégylé (1,5  $\mu$ g / kg par semaine) peuvent être utilisés dans le traitement de l'infection chronique par le VHD. (41) Actuellement, les patients sont traités par PEG-INF pendant au moins 48 semaines avec une quantification de l'ARN VHD, de l'ADN VHB et de l'Ag HBs tous les trois mois. La détection de l'ADN VHB impliquera l'utilisation, en complément de l'INF, d'un analogue nucléos(t)idique. (35) Généralement, le PEG-IFN entraîne, pendant le traitement, une amélioration avec normalisation des transaminases et disparition de l'ARN VHD. Cependant, tous les patients ne répondent pas à ce traitement. Même si les patients ont une réponse virologique et biochimique (disparition de l'ARN VHD et normalisation des transaminases), la durée du traitement doit souvent dépasser 2 ans voire 5 ans. (42) Plusieurs stratégies ont été explorées pour améliorer l'efficacité de l'IFN  $\alpha$ , notamment une durée de traitement plus longue, mais la plupart des patients n'ont toujours pas réussi à éliminer le VHD et le taux de rechute reste élevé. (43) En effet, la rechute est quasiment inévitable si le traitement est arrêté trop tôt. (44) Les taux de guérison sont estimés entre 25% et 40%, les rechutes étant souvent la règle à l'arrêt du traitement. (28) Cependant, le traitement optimal du VHD est

incertain et les patients peuvent être dirigés vers des centres spécialisés proposant des thérapies expérimentales. (41)

La **Figure 18** résume l'efficacité des traitements sur la disparition de l'ARN viral selon les différentes études six mois après l'arrêt de l'IFN-PEG. Malheureusement, en ajoutant des analogues de nucléosides ou de nucléotides, on n'améliore pas la réponse virologique à long terme dans l'infection VHD. (*Virus de l'Hépatite Delta, F. Le Gal, 2018*)



**Figure 18. Résultats en pourcentage de réponse virologique à long terme dans les principales études cliniques sur l'efficacité d'un traitement par l'INF-PEG dans les infections chroniques B-delta.** La médiane de réponse virologique à long terme se situerait aux alentours de 27,5 % en fonction du traitement, respectivement : RBV : ribavirine, LAM : lamivudine ; ADV : adéfovir ; TDF : ténofovir. (*Virus de l'Hépatite Delta, F. Le Gal, 2018*)

### Suivi du traitement par PEG-IFN:

Étant donné que le virus a besoin d'AgHBs pour produire des particules virales infectieuses, la réduction des niveaux d' AgHBs, voire l'obtention de la clairance de l'AgHBs, revêt une importance considérable dans le traitement de l'infection par le VHD et le VHB. (46) La charge virale VHB est aussi un élément important de suivi des patients. Elle est souvent inhibée lors de la réplication du VHD. Des mécanismes moléculaires ont été

proposés pour rendre compte de cette observation. La quantification de l'ADN VHB permet aussi au clinicien de faire les choix thérapeutiques par analogues de nucléos(t)ides et/ou IFN $\alpha$  pégylé en cas de coréplication des deux virus ou de la prédominance de l'un d'entre eux. (28) L'ARN VHD est à suivre au cours du traitement et après pendant trois à six mois. (47) A titre d'exemple, l'IFN $\alpha$ -2a pégylé est arrêté s'il n'y a pas de réduction de la charge virale VHD après un an de traitement. (48)

La clairance prolongée de l'ARN VHD, la séroconversion de l'AgHBs, la normalisation des transaminases et l'amélioration histologique sont les résultats les plus importants. (48)

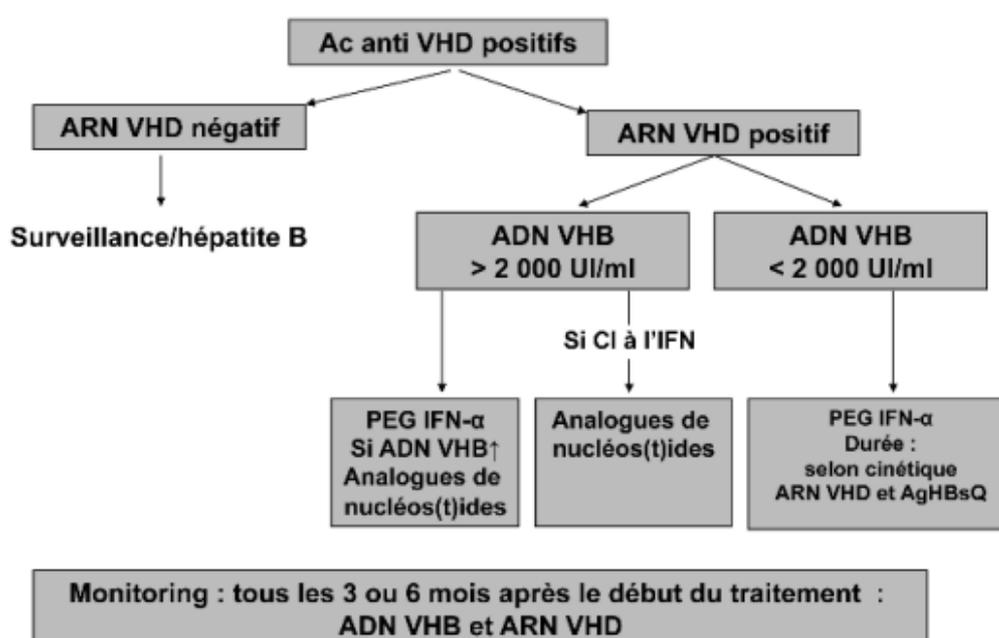


Figure 19. Prise en charge des coinfections/surinfections Delta (42)

#### IV.2.2. Inhibiteurs de l'entrée virale : Bulevirtide®

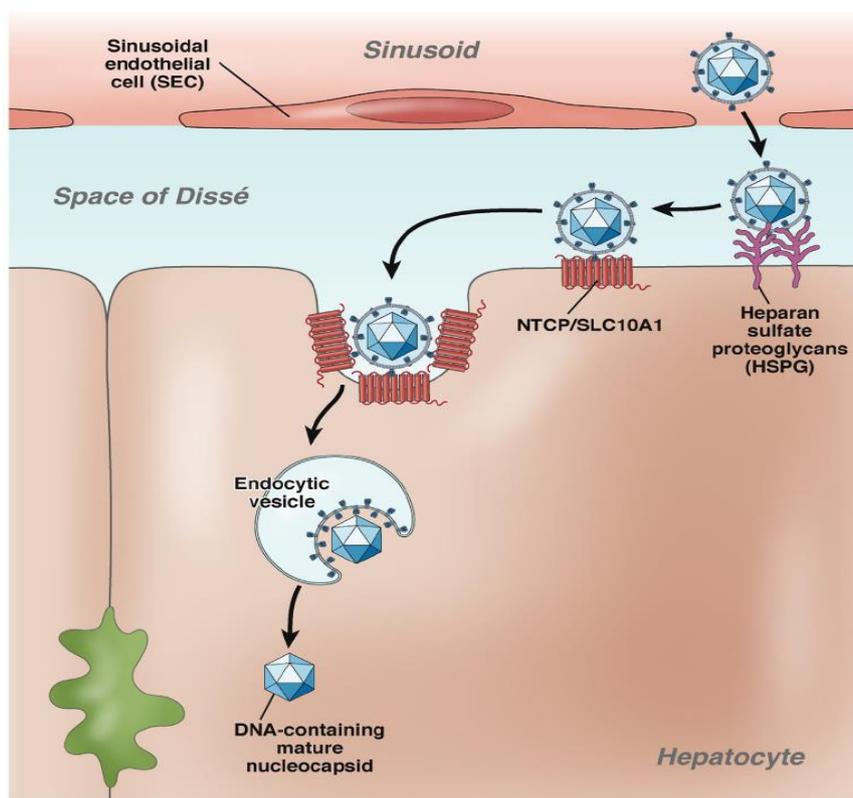
Une stratégie d'inhibition de l'entrée virale peut mener à un contrôle de l'infection par inhibition de la propagation de celle-ci. Ceci aurait un effet non seulement dans l'installation initiale de l'infection mais surtout, dans le cadre d'une infection chronique, dans la diminution progressive du pool de cellules infectées, résultant d'une inhibition de l'infection de nouvelles cellules associée à la mort des cellules infectées et à la régénération hépatocytaire. Il a été développé un peptide synthétique capable d'inhiber de façon

puissante l'entrée aussi bien du VHB que du VHD, *in vitro* et dans le modèle murin. Ce lipopeptide (47-aa) dérivé de la protéine pré-S1 du VHB est appelé Bulevirtide®. La monothérapie avec le Bulevirtide® (une injection sous-cutanée/jour) a été associée à une diminution significative de la charge virale du VHD et à une normalisation des niveaux des ALAT. L'effet antiviral a été plus important dans la combinaison Bulevirtide® – INF- $\alpha$ , ce qui suggèrerait un effet synergique. (5) Par ailleurs, les résultats montrent une bonne tolérance. (51)

Mode d'action Bulevirtide® :

### →Entrée inhibée du VHB et du VHD dans les hépatocytes :

L'identification du NA taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) en tant que véritable récepteur du VHB et du VHD a constitué une avancée majeure. Les chercheurs disposent désormais d'un système amélioré pour étudier l'entrée du VHB (**Figure 20**) et peuvent établir des lignées cellulaires en permettant une réplication efficace du VHB et du VHD. (49)



**Figure 20. Modèle d'entrée du VHB et du VHD dans les hépatocytes (49)**

En raison des similitudes structurales avec le VHB, le Bulevirtide® bloque l'entrée de novo du VHB et du VHD dans les hépatocytes en se liant au NTCP qui sert de récepteur d'entrée essentiel au VHB et au VHD dans les hépatocytes. Le blocage du récepteur NTCP par le Bulevirtide conduit à une diminution globale des cellules infectées. (*ATU de cohorte Bulevirtide, Septembre 2019*)

## ATU Bulevirtide®

L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a accordé le **09/09/2019**, une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) dite "de cohorte" à MYR GmbH pour Bulevirtide® 2 mg, poudre pour solution injectable sous-cutanée.

### Indications :

Traitement de l'infection chronique par le VHD chez les adultes :

- 1) présentant une cirrhose hépatique compensée ou une fibrose de grade 3 (évaluée par biopsie hépatique ou Fibroscan), ou
- 2) présentant une fibrose hépatique de grade 2 avec cytolysse hépatique persistante (ALAT>2N depuis au moins 6 mois)

**La sécurité d'emploi et l'efficacité du Bulevirtide®** dans le traitement de l'hépatite chronique delta ont été évaluées dans deux études de phase II : MYR 202 et MYR 203.

→ Dans l'étude **MYR 202**, menée chez des patients atteints d'une infection chronique par le VHD, le Bulevirtide® a été administré à des doses quotidiennes de 2 mg, 5 mg ou 10 mg avec l'inhibiteur de la transcriptase inverse **Ténofovir®** pendant 24 semaines. *(ATU de cohorte- protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations. Bulevirtide 2 mg poudre pour solution injectable. Septembre 2019)*

Des patients présentant une cirrhose hépatique, ou des patients en échec au traitement antérieur par PEG-IFN ou pour lesquels ce traitement était contre-indiqué (notamment en cas d'antécédent d'intolérance au PEG-IFN) ont été inclus. Au total, 120 patients ont été randomisés dans quatre bras de traitement pour recevoir des injections SC de Bulevirtide® à raison de 2 mg/jour, 5 mg/jour et 10 mg/jour en plus du ténofovir (TDF), ou le ténofovir seul pendant 24 semaines. La moitié (50 %) des participants présentait une cirrhose hépatique à l'inclusion.

Le tableau ci-dessous résume les résultats d'efficacité dans la population en intention de traiter modifiée (mITT) à la semaine 24 :

Réponse en termes d'ARN du VHD	Bras A : (n = 28) bulevirtide 2 mg + TDF	Bras B : (n = 32) bulevirtide 5 mg + TDF	Bras C : (n = 30) bulevirtide 10 mg + TDF	Bras D : (n = 28) TDF
Patients présentant une ARN du VHD indétectable ou une diminution de $\geq 2 \log_{10}$ entre l'inclusion et la semaine 24	53,6 %***	50,0 %***	76,7 %***	3,6%
Patients présentant une ARN du VHD indétectable ou une baisse de $> 2 \log$ et un taux normal d'ALT à semaine 24	21,4* %	28,1 % *	36,7 % **	0,0%
Patients présentant une normalisation du taux d'ALT	42,9* %	50,0** %	40,0* %	7,1 %

\*valeur de  $p \leq 0,05$

\*\*valeur de  $p \leq 0,001$

\*\*\* valeur de  $p \leq 0,0001$

TDF = Ténofovir

**Tableau 3. Résultats de l'étude clinique MYR 202**

*(Annexe I résumé des caractéristiques du produit)*

→ Dans l'étude **MYR 203**, Bulevirtide® a été administré en monothérapie à la dose de 2mg/jour ou en combinaison avec le **PEG-IFN $\alpha$**  à deux doses (2 mg/jour et 5mg/jour) pendant 48 semaines. Deux autres études sont planifiées évaluant le Bulevirtide® à la dose de 2mg et 10mg associé au PEG-IFN versus la monothérapie. *(ATU de cohorte- protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations. Bulevirtide 2 mg poudre pour solution injectable. Septembre 2019)*

Un total de 60 patients a été randomisé en quatre bras de traitement, recevant : 180 $\mu$ g PEG-IFN $\alpha$  ou 2 mg Bulevirtide® en combinaison avec PEG-IFN $\alpha$ , ou 5 mg Bulevirtide® en combinaison avec PEG-IFN $\alpha$ , ou 2 mg Bulevirtide® pendant 48 semaines, suivis d'un intervalle de 24 semaines libre de tout traitement. PEG-IFN $\alpha$  a été administré une fois par semaine, Bulevirtide® une fois par jour, les deux en injections SC.

Le tableau ci-dessous résume les résultats d'efficacité à la semaine 48 et à la semaine 72, soit 24 semaines après l'arrêt du traitement :

Réponse en termes d'ARN du VHD	Bras A: (n=15) PEG-IFN $\alpha$	Bras B: (n=15) 2mg bulevirtide + PEG-IFN $\alpha$	Bras C: (n=15) 5mg bulevirtide + PEG-IFN $\alpha$	Bras D: (n=15) 2mg bulevirtide
Patients présentant une ARN du VHD indétectable : à semaine 48 à semaine 72	13.3% 0.0%	80.0%** 53.3% *	86.7%** 26.7%	13.3% 6.7%
Réponse HBsAg (réduction >1log ou négativation) à semaine 72	0.0%	40%*	13.3%	0.0%
Patients présentant une ARN du VHD indétectable et un taux d'ALT normal : à semaine 72	0%	46.7% *	13.3%	6.7%
Patients présentant une normalisation du taux d'ALT: à semaine 48 à semaine 72	26.7% 10%	26.7% 53.8%	46.7% 33.3%	73.3%* 23.1%

\* valeur de  $p \leq 0.05$ , \*\*valeur de  $p \leq 0.001$

**Tableau 4. Résultats de l'étude clinique MYR 203**

*(Annexe I résumé des caractéristiques du produit)*

#### Co-infection par le VIH:

Bulevirtide® n'a pas été étudié chez des patients coinfecteds par les virus VIH/VHB/VHD.

Une utilisation pourrait être envisagée chez les patients présentant une infection VIH contrôlée sous multithérapie (patient sous combinaison d'antirétroviraux ayant obtenu une charge virale indétectable de façon prolongée et des CD4 >500/mm<sup>3</sup>). L'utilisation du Bulevirtide® chez les patients coinfecteds nécessite une vigilance particulière, notamment sur le plan de la toxicité hépatique.

#### Posologie et mode d'administration du Bulevirtide®:

Le Bulevirtide® doit être administré chez les adultes à la dose de 2 mg une fois par jour par injection sous-cutanée (partie supérieure du bras ou de la cuisse, ou au niveau de l'abdomen).

Le schéma optimal de traitement n'est pas connu à ce stade. L'association du Bulevirtide® au PEG-IFN devrait être envisagée chez les patients pouvant le tolérer. En effet, les données cliniques disponibles pendant 48 semaines suggèrent que l'association du Bulevirtide® au PEG-IFN alfa optimise la réponse au traitement.

Dans le cas d'une réaction indésirable grave liée au PEG-IFN, le traitement doit être interrompu ou la dose doit être réduite selon la RCP du PEG-IFN. Si le traitement avec PEG-IFN est arrêté, l'administration de Bulevirtide® peut être continuée en monothérapie.

### Modification de la dose chez les adultes en cas de réponse insuffisante :

Des données préliminaires suggèrent qu'une optimisation de la réponse au traitement serait obtenue avec la dose à 10mg. Bien que cette stratégie n'ait pas été spécifiquement testée dans les études cliniques, une augmentation de la dose à 10 mg SC par jour peut être envisagée en cas de réponse jugée insuffisante. L'augmentation de la dose devra être discutée au sein d'une réunion de consultation pluridisciplinaire.

Les critères suivants sont proposés par le laboratoire pour envisager une intensification de la dose :

- Après 12 semaines de traitement :
  - réduction de  $<1$  log d'ARN VHD et
  - absence de normalisation du taux d'ALAT ou diminution du taux d'ALAT  $< 50\%$  par rapport au taux de base d'ALAT
- Après 24 semaines de traitement :
  - réduction de  $<2$  log d'ARN VHD et
  - absence de normalisation du taux d'ALAT ou diminution du taux d'ALAT  $< 50\%$  par rapport au taux de base d'ALAT

### **Durée du traitement**

La durée optimale du traitement n'est pas connue. Des études testant une administration du Bulevirtide® sur une durée prolongée, notamment **jusqu'à 144 semaines**, sont planifiées.

### **Populations spéciales**

#### Insuffisance rénale

Aucune étude n'a été conduite avec le Bulevirtide® chez les patients présentant une insuffisance rénale. Son utilisation n'est pas recommandée chez les patients présentant une clairance à la créatinine  $< 60$ ml/min.

La fonction rénale doit être attentivement surveillée. Une élévation des sels biliaries peut se produire sous traitement. Compte tenu de l'excrétion rénale des sels biliaries, l'élévation des sels biliaries peut être plus importante chez les patients souffrant d'insuffisance rénale.

#### Insuffisance hépatique

Aucun ajustement de la posologie n'est nécessaire chez les patients présentant une insuffisance hépatique légère. La sécurité et l'efficacité de Bulevirtide® chez les patients ayant une cirrhose décompensée n'ont pas encore été établies.

#### Population pédiatrique

La sécurité et l'efficacité de Bulevirtide® chez les patients âgés de moins de 18 ans n'ont pas été établies. Aucune donnée n'est disponible.

### Contre-indications

- hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients
- cirrhose hépatique décompensée

*(Annexe I résumé des caractéristiques du produit)*

### Effets indésirables

Les effets indésirables fréquents et très fréquents rapportés dans les études de phase 2 sont énumérés dans le **Tableau 5** par classe de systèmes d'organes et par fréquence absolue. Les fréquences sont définies comme suit : très fréquent ( $\geq 1/10$ ), fréquent ( $\geq 1/100$ ,  $< 1/10$ ), peu fréquent ( $\geq 1/1\ 000$ ,  $< 1/100$ ), rare ( $\geq 1/10\ 000$ ,  $< 1/1\ 000$ ), très rare ( $< 1/10\ 000$ ).

Classe de systèmes d'organes MedDRA	Effets indésirables	
	Très fréquent (≥ 1/10)	Fréquent (≥1/100, < 1/10)
Affections hématologiques et du système lymphatique		Leucopénie Neutropénie Réticulopénie Thrombopénie Lymphopénie
Affections du système nerveux		Céphalées Vertiges
Affections cardiaques		Tachycardie
Affections gastro-intestinales		Nausées Distension abdominale
Affections de la peau et du tissu sous-cutané		Prurit
Affection générale et au site d'administration		Asthénie Fatigue Syndromes grippaux Érythème au site d'injection Hématome au site d'injection Prurit au site d'injection
Affection musculosquelettique et du tissu conjonctif		Spasmes musculaires Arthralgie
Investigations	Augmentation des acides biliaires totaux	Augmentation du taux d'ALT <sup>(1)</sup> Augmentation du taux d'AST Augmentation du taux de GGT Augmentation du taux d'amylase Augmentation du taux de lipase Réduction du taux de hémoglobine
		Augmentation de l'INR Réduction du taux de neutrophiles

(1) La majorité des élévations de taux d'ALAT ont été déclarés après l'arrêt du traitement et peuvent être liées à une exacerbation de l'hépatite après l'arrêt du traitement antiviral

**Tableau 5. Effets indésirables du Bulevirtide®**

*(Annexe I résumé des caractéristiques du produit)*

### IV.2.3. Inhibiteurs de l'assemblage viral

L'assemblage des nouvelles particules virales du VHD dans les cellules infectées est dépendant de l'interaction entre la ribonucléoprotéine du VHD (L-AgHD) et l'AgHBs. Il a été montré que cette interaction nécessite que L-AgHD soit modifiée par farnésylation (médiée par des enzymes cellulaires, les farnésyltransférases) et que l'inhibition de cette réaction (*in vitro* et *in vivo*) conduit à l'inhibition de la sécrétion des particules virales. (53) Des inhibiteurs de farnésylation ont été précédemment utilisés en cancérologie, pour le blocage des formes oncogéniques. (5) Une de ces molécules, le **Lonafarnib**, qui à l'origine a été synthétisé et développé pour les thérapies antitumorales, s'est avéré efficace pour l'inhibition de la libération des particules du VHD et est actuellement en évaluation clinique pour le traitement de l'hépatite delta chronique. (51)

Pour le VHD, une étude de phase IIa randomisée en double aveugle montre une décroissance du titre de l'ARN du VHD avec un effet dose chez 14 patients traités pendant 28 jours par le Lonafarnib à 100 mg ou 200 mg, respectivement de -0,75 à -1,54 log<sub>10</sub> UI/mL. (*Virus de l'Hépatite Delta, F. Le Gal, 2018*)

### IV.2.4. Polymères d'acides nucléiques

Une autre stratégie ciblant la sécrétion du virus a récemment montré des résultats prometteurs, aussi bien *in vitro* que dans une évaluation clinique préliminaire. Celle-ci est basée sur l'utilisation de polymères d'acides nucléiques (**NAPs** ; comme **REP-2139** par exemple), qui a été associée à l'inhibition de la sécrétion de l'AgHBs. Chez des patients infectés par le VHB, cette stratégie semble mener non seulement à une diminution directe de la virémie par inhibition de la sécrétion de particules virales, mais aussi à une diminution de 2–7 log des niveaux sériques de l'AgHBs, associée à l'apparition d'anticorps anti-HBs, ce qui suggère une stimulation de la réponse immunitaire humorale contre le virus. (54)

## IV.3. Traitement du CHC

La transplantation hépatique est la seule option thérapeutique valable pour les maladies du foie en phase terminale liées au VHD. Le risque de réinfection du greffon par le VHD s'est révélé être inférieur à celui de la réinfection par le VHB et peut être prévenu par l'administration continue d'immunoglobulines anti-HBs. (44)

## IV.4. Prévention

La **vaccination** contre le VHB protège efficacement contre une infection par le VHD. (Traité de virologie médicale, 2019, chapitre 27B page 401, S Bricher)

Bien que la prévention de l'infection simultanée VHB/VHD chez des individus naïfs puisse être efficacement réalisée avec des Ac anti-HBs obtenus avec des vaccins anti-VHB classiques, des Ac anti-HBs ne peuvent pas être induits par la vaccination chez les personnes infectées de façon chronique par le VHB. Donc, chez les porteurs chroniques du VHB aucune mesure d'immunoprophylaxie n'est actuellement disponible pour prévenir la surinfection par le VHD. Les stratégies vaccinales étudiées dans des modèles animaux n'ont pas été efficaces dans la prévention de la surinfection par le VHD. (55)

La prophylaxie passive avec des **immunoglobulines** anti-VHB n'a pas complètement empêché la réinfection du foie transplanté par le VHD. Chez certains patients, les virions du VHD ont pu infecter et se répliquer dans l'allogreffe hépatique. (6) De nouvelles stratégies de prévention de la récurrence virale dans les organes greffés pourraient être testées avec l'administration d'analogues de nucléos(t)ides, avant et après greffe, et d'inhibiteurs d'entrée juste après la greffe. Dans les foies transplantés chez des patients présentant une coinfection par le VHB et le VHD, il a été démontré que le VHD établissait des infections asymptomatiques latentes sans l'assistance apparente d'une réplication active du VHB. Les inhibiteurs d'entrée pourraient donc prévenir la récurrence de l'infection par le VHB dans le greffon. (49)

# PARTIE II : TRAVAUX PERSONNELS

## I. But de l'étude

Le VHD s'est révélé être un virus hautement pathogène responsable des formes les plus graves d'hépatite aiguë, notamment l'hépatite fulminante, et d'hépatite chronique chez les personnes positives pour l'AgHBs. La recherche d'une coinfection delta grâce à la sérologie VHD doit obligatoirement être réalisée au moins une fois chez tous les sujets porteurs de l'Ag HBs. Lorsque la sérologie VHD est positive, il conviendra de rechercher une éventuelle réplication virale. La présence d'ARN Delta permet aux cliniciens non seulement de confirmer le caractère répliatif de l'infection, mais aussi de mesurer l'efficacité du traitement institué et de suivre les patients par la charge virale.

L'objectif principal de cette étude était de réaliser la validation biologique de méthode de la trousse EurobioPlex VHD au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux, en vue de son utilisation ultérieure en « routine ».

## II. Matériels et méthodes

### II.1. Echantillons

Nous avons sélectionné rétrospectivement, 23 échantillons de patients avec différents niveaux de CV VHD obtenues à partir des résultats transmis par le CNR associé Hépatite Delta (Hôpital Avicenne, Bobigny) qui utilise la trousse EurobioPlex VHD (Eurobio) lors d'une demande de quantification de l'ARN VHD par le laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux entre le 1<sup>er</sup> Mars 2018 et le 1<sup>er</sup> Août 2019.

Au total, 170 demandes de quantification de l'ARN VHD ont été adressées à notre laboratoire par différents services du CHU de Bordeaux sur cette période : 62 demandes ont été annulées en raison de la négativité de l'AgHbs et 108 plasmas ont été envoyés au CNR VHD. Les résultats sont les suivants : 21 patients avaient une CV VHD positive (de 4.26 log<sub>10</sub> UI/mL à 8.05 log<sub>10</sub> UI/mL), 4 patients avaient une CV VHD détectable non quantifiable (<3 log<sub>10</sub> UI/mL) et 83 patients avaient une CV VHD indétectable (<2 log<sub>10</sub> UI/mL) - **Figure 21**. La limite de quantification LOQ de la technique EurobioPlex VHD est à 3 log<sub>10</sub> UI/ml et la limite de détection LOD à 2 log<sub>10</sub> UI/ml, telles que validées par le CNR associé Hépatite Delta.

L'analyse a été réalisée à partir d'un tube EDTA envoyé par les services demandeurs à +5°C, centrifugé, décanté ; les aliquots du plasma ont été transportés à l'Hôpital Avicenne à -20°C. Le reste du plasma a été ensuite congelé à -80°C pour conservation dans la sérothèque du CHU de Bordeaux et décongelés pour la réalisation de la comparaison de méthodes juste avant utilisation.

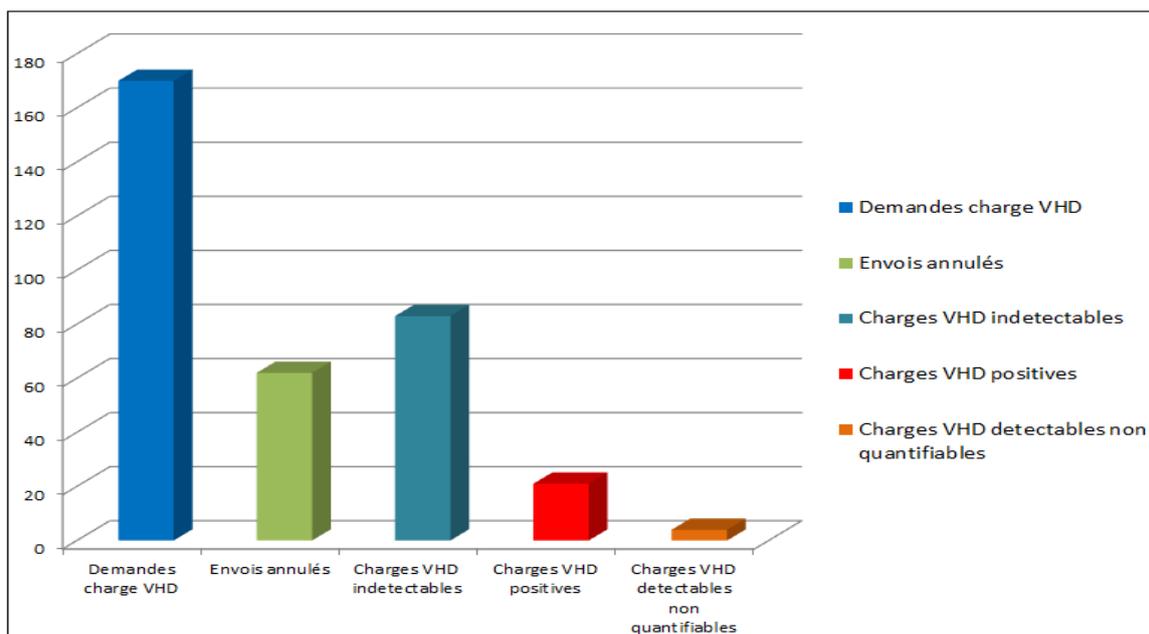


Figure 21. CV VHD dans la période Mars 2018 – Aout 2019 au CHU de Bordeaux

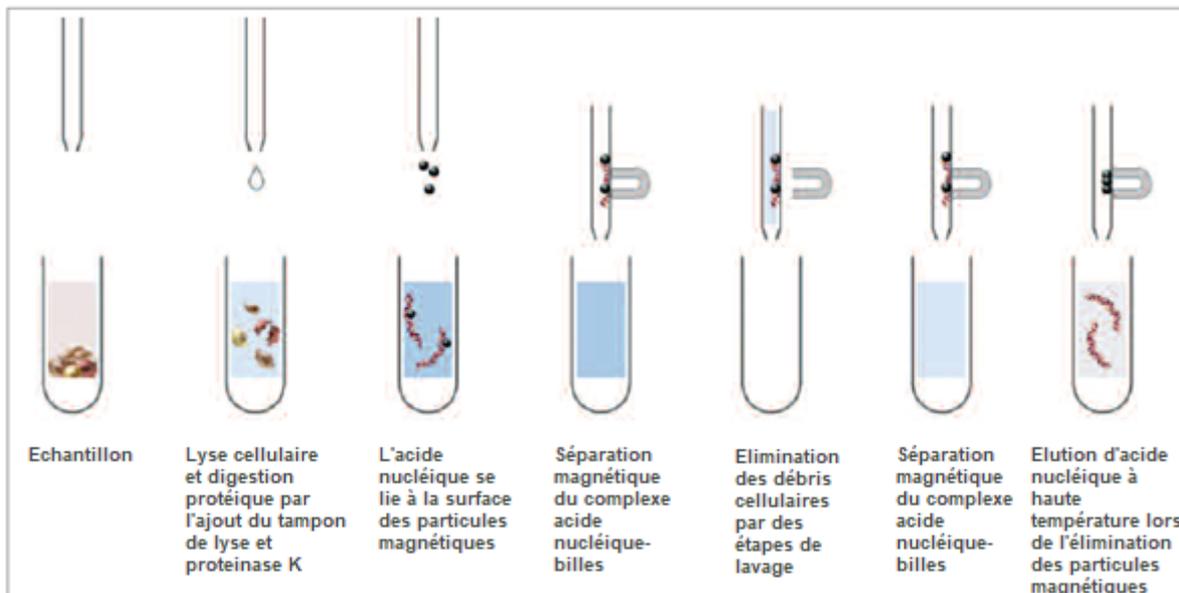
## II.2. Automates

L'extraction de l'ARN VHD plasmatique a été réalisée à l'aide de l'automate MagNA Pure Compact ROCHE (**Figure 22 et 23**) et la PCR VHD sur l'automate LightCycler 480 ROCHE (**Figure 24**).



**Figure 22. MagNA Pure Compact ROCHE**

L'automate utilise une technologie de billes magnétiques et incorpore une variété de protocoles utilisant différentes quantités d'échantillons (100 à 1 000  $\mu$ l) et des volumes d'élution (50 à 200  $\mu$ l) à partir d'une grande variété de matériaux d'échantillonnage (sang, cellules sanguines, sérum, plasma, tissus ou cellules en culture).



**Figure 23. Schéma du principe de purification d'acides nucléiques à l'aide du MagNA Pure Compact**



**Figure 24. LightCycler 480 ROCHE**

### II.3. Trousse EurobioPlex VHD qRT-PCR

La trousse EurobioPlex Hépatite Delta est un test d'amplification qui permet une quantification de l'ARN du VHD, ainsi que d'un contrôle ARN d'extraction et d'inhibition, par RT-PCR en temps réel multiplex, en une seule étape, avec une chimie de type Taqman. Le contrôle interne ARN (RC) permet le contrôle de toutes les étapes de la phase d'extraction de l'ARN à partir des échantillons sanguins jusqu'à la phase d'amplification, permettant ainsi la mise en évidence éventuelle d'inhibiteurs de PCR ou d'un problème technique.

Le test est réalisé à partir de l'ARN extrait de l'échantillon par une réaction unique dans un seul puits/tube. Le virus de l'hépatite Delta est détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM et le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR est détecté à l'aide d'une sonde marquée HEX (**Tableau 6**). Ces marqueurs émettent une fluorescence spécifique suite à leur hydrolyse au cours de l'élongation du produit de l'amplification. La mesure des intensités de fluorescence en temps réel est proportionnelle à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques. Ce système d'amplification a été validé sur un ARN standard comportant un insert spécifique du VHD (Contrôle positif VHD-QS), ainsi que sur l'étalon international du Paul Ehrlich Institut et sur un contrôle interne ARN (RC), en utilisant l'automate CFX96 qRT-PCR. (Mode d'emploi kit EurobioPlex VHD qRT-PCR)

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
VHD	FAM	495 nm	520 nm
ARN Contrôle (RC)	HEX	538 nm	555 nm

**Tableau 6. Sondes utilisées au cours de la PCR VHD**

## II.4. Réalisation de la PCR VHD

Les séries de PCR VHD doivent inclure, en plus des échantillons de patients: un contrôle positif hépatite D (standard VHD-QS), un contrôle positif RC (CP-RC), un contrôle négatif (eau PCR) ainsi qu'un contrôle d'extraction et d'amplification par RT-PCR (RC) ayant été rajouté à chaque échantillon avant extraction. Le contrôle positif VHD-QS contient une concentration élevée de matrice ( $1.10^7$  copies/ 10  $\mu$ L) donc les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.

Dans un premier temps, une extraction de l'ARN est réalisée comme montré dans la **Figure 25** suivie par une préparation du mélange réactionnel (**Tableau 7**).

MagNA Pure Compact
Plasma vol : 400 $\mu$ L
IC (RC) : 10 $\mu$ L
Éluat vol : 50 $\mu$ L
PCR sample vol : 10 $\mu$ L

Figure 25. Extraction d'ARN d'un échantillon

	Volume en $\mu$ L (1 test)
2x Reaction Mix	12,5
Reverse Transcriptase	0,5
Amorces/sondes VHD-RC	1
Eau	1,3

Tableau 7. Préparation du mélange réactionnel de la qRT-PCR VHD

Ensuite, les solutions sont distribuées comme dans la **Figure 26**. Une réaction de PCR dure environ deux heures selon le programme de qPCR indiqué dans le **Tableau 8**.

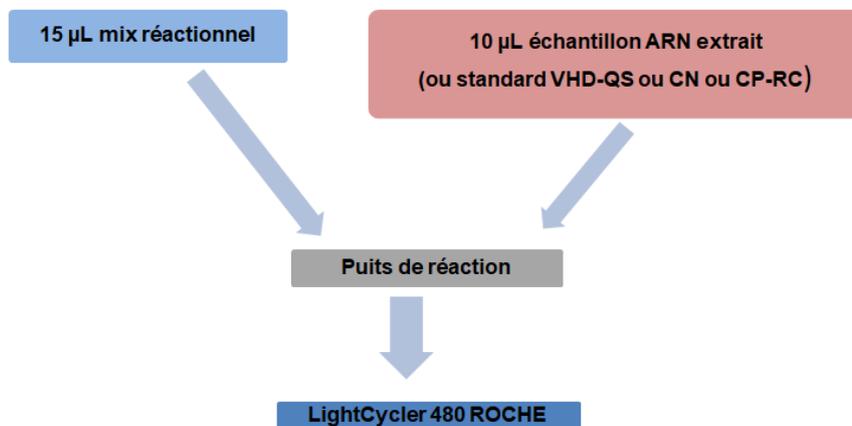


Figure 26. Protocole de qRT-PCR

Etapes PCR	Température	Durée	Cycle(s)	
Reverse Transcription	46 °C	30 min	1	-
Dénaturation	95 °C	2 min	1	-
Amplification	95 °C	15 sec	45	-
	59 °C	1 min		Acquisition de fluorescence

**Tableau 8. Programme qRT-PCR**

## II.5. Validation de la PCR VHD

Contrôle négatif : Pour valider une série de PCR VHD, aucune amplification ne doit être visible sur le canal FAM pour le contrôle négatif. La même chose est valable pour le canal HEX : aucune amplification ne doit apparaître mais il est possible de visualiser un faible signal de fluorescence. Dans ce cas, la barre de seuil doit être positionnée juste au-dessus du maximum de signal du contrôle négatif.

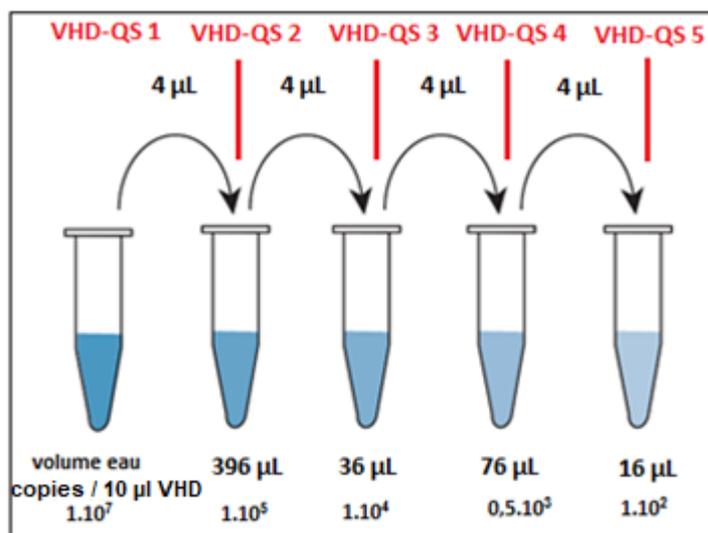
Contrôle interne positif : La valeur de Ct sur le canal HEX du contrôle interne positif doit être  $\leq 38$  et l'efficacité de la PCR sur le canal FAM doit être  $> 90\%$  (équivalent à une pente  $> -3,6$ ).

Gamme de quantification : En ce qui concerne les valeurs de la gamme de quantification VHD-QS, les valeurs de Ct des standards sur le canal FAM doivent être à  $\pm 3$  Ct des valeurs du tableau ci-dessous (**Tableau 9**) :

VHD-QS	molécules/10 $\mu$ L	Ct FAM
QS1	$1^{E+07}$	15.8
QS2	$1^{E+05}$	21.8
QS3	$1^{E+04}$	24.8
QS4	$0,5^{E+03}$	29.8
QS5	$1^{E+02}$	31.5

**Tableau 9. Valeurs de la gamme de quantification VHD-QS**

Pour une analyse quantitative, le programme PCR nécessite l'ajout de 5 cycles d'amplification pour augmenter la probabilité de détection des positifs faibles. Pour obtenir des points de gamme, il a été nécessaire de préparer 4 dilutions à partir du tube standard de VHD-QS fourni. (**Figure 27**)



**Figure 27. Dilutions des standards VHD-QS**

## II.6. Analyse des données et interprétation

### II.6.1. Analyse du contrôle interne RC dans les échantillons :

La valeur positive du contrôle RC d'extraction et d'amplification ( $Ct \leq 38$ ) montre que l'ARN a été correctement extrait et il n'y a pas d'inhibiteurs de RT-PCR, donc le résultat peut être validé.

Par contre, si le contrôle RC a une valeur négative ( $Ct > 38$ ), cela signifie soit que l'ARN n'a pas été correctement extrait, soit que la RT n'a pas bien fonctionné, soit qu'il y a des inhibiteurs de PCR. Il est alors recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon.

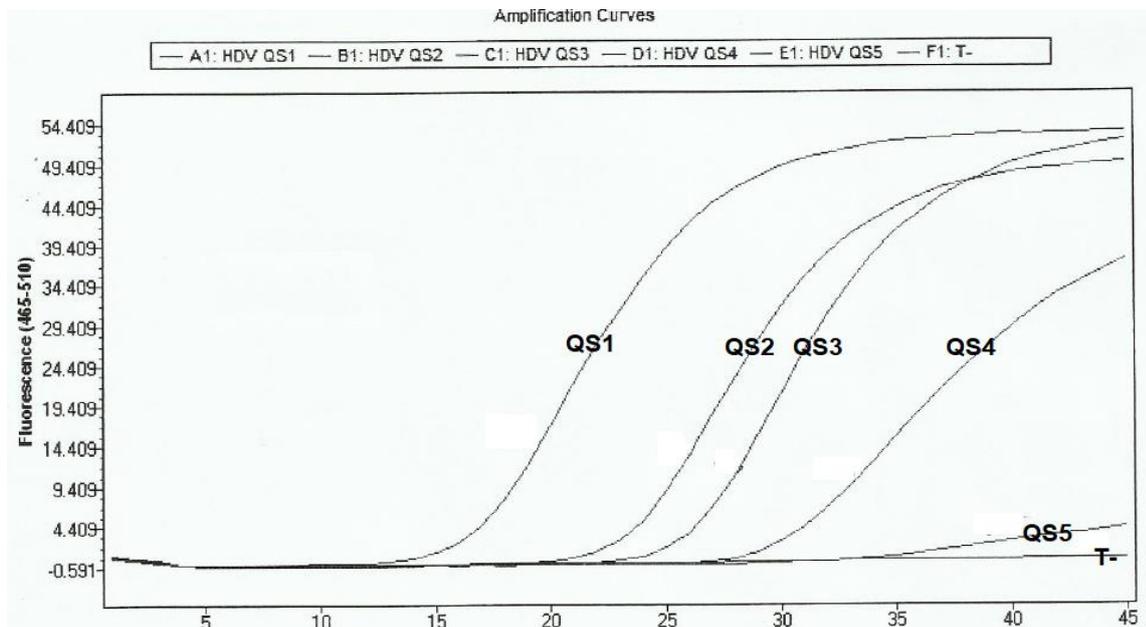
### II.6.2. Interprétation des résultats pour l'ARN VHD :

Un  $Ct \leq 35$  montre la positivité de l'analyse, un  $Ct > 35$  et  $\leq 45$  signe un résultat positif non quantifiable (réplication virale très faible inférieure au seuil bas de quantification du test). Enfin, un  $Ct > 45$  signifie que le résultat est négatif.

## III. Résultats

### III.1. Utilisation du Standard OMS

Le standard OMS (Organisation mondiale de la santé) est utilisé pour la standardisation des tests basés sur la technique d'amplification d'acide nucléique pour le VHD, ce qui permet d'exprimer les résultats des charges virales VHD en UI/mL, grâce à un facteur de conversion. Pour cette étape, une **gamme en 5 points** a été faite. Les résultats sont comparables par rapport aux autres gammes réalisées et les critères d'acceptation obtenus : valeurs de la gamme de quantification VHD-QS respectées (**Tableau 10**), efficacité >90% = pente > -3,6 (**Figure 28**).



VHD-QS	Attendu			EurobioPlex VHD qRT-PCR Bordeaux			
	+/-3 Ct FAM	Molécules /10 µl	Copies/mL	Ct	Copies/mL	UI/mL	Log10 UI/mL
QS1	15.8	1 <sup>E</sup> +07	125 000 000	16.84	137 000 000	24 660 000	7.39
QS2	21.8	1 <sup>E</sup> +05	1 250 000	23.45	959 000	172 620	5.23
QS3	24.8	1 <sup>E</sup> +04	125 000	25.99	142 000	25 560	4.40
QS4	29.8	5 <sup>E</sup> +02	6 250	30.08	6 540	1 177	3.07
QS5	31.5	1 <sup>E</sup> +02	1 250	33.72	1 250	225	2.35

**Table 10. Comparaison des valeurs de la gamme de quantification VHD-QS (Standard OMS)**

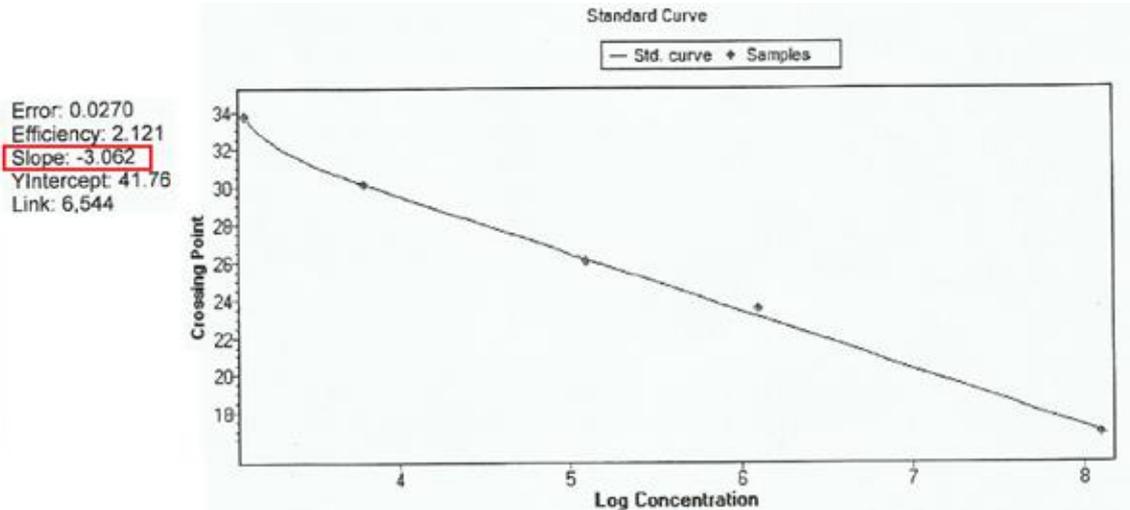


Figure 28. L'efficacité de la PCR sur le canal FAM

Ensuite, trois manipulations successives, passées chacune 2 fois, ont été réalisées : chaque run de PCR a testé le **Standard OMS pur**, dilué au **1/10<sup>ème</sup>** et au **1/100<sup>ème</sup>**, comme décrit dans le schéma ci-dessous (**Figure 40**).

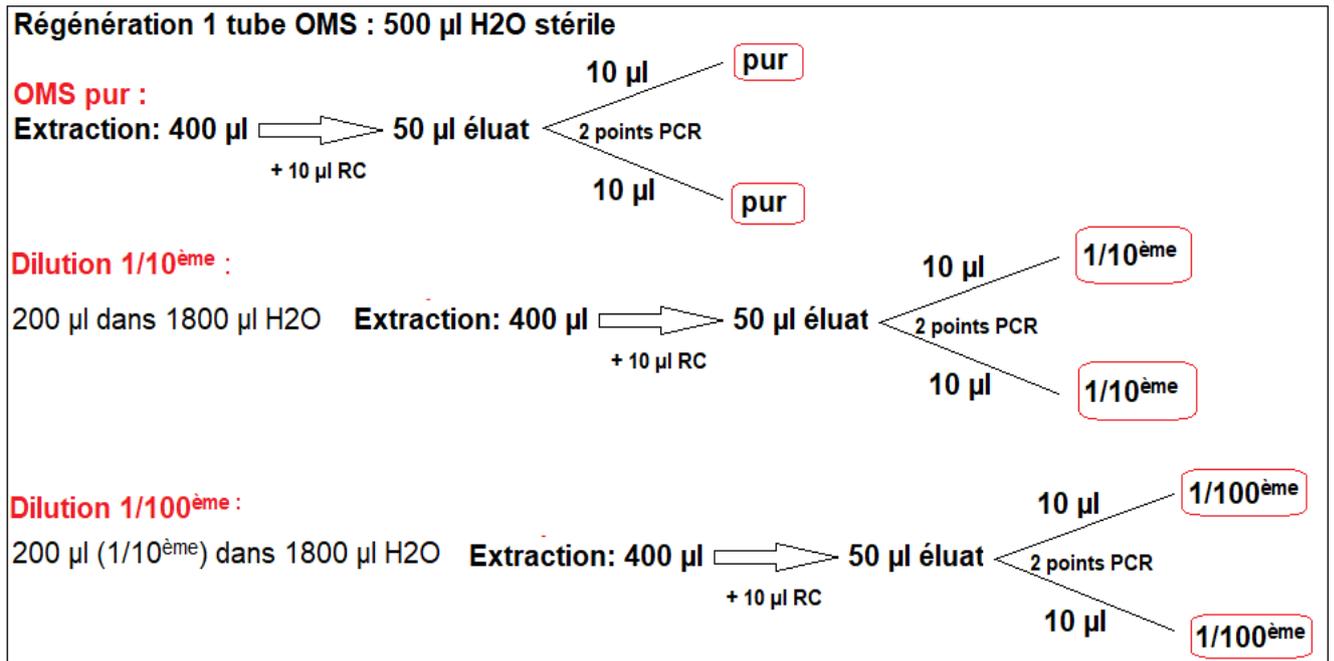


Figure 29. Dilutions du Standard OMS

## Le facteur de conversion

Le facteur de conversion, qui permet la conversion copies/mL en UI/mL, dépend des résultats obtenus avec le Standard OMS dont la valeur donnée de concentration est **575.000 UI/mL**.

Le calcul du facteur de conversion d'après les recommandations du NISBC, utilisant la moyenne géométrique des dilutions, puis celle des moyennes par essai (GMT) est la suivante :

$$\text{OMS/GMT} \rightarrow 575.000 / 3124449,574 = 0,18 \text{ (Figure 30)}$$

Dilution	1	2	3	1	2	3	4				
Valeur théorique attendue en UI/mL	575,000	57,500	5,750	calcul de la valeur du WHO pour chaque dilution				moyennes géométriques des valeurs pour chaque essai (gomme l'effet de gamme)	moyenne géométrique des essais donne la valeur du WHO dans cette matrice avec cette technique	coefficient de corrélation a=WHO/GMT	
Résultat en copies essai 1	3150000	276000	41000	3150000	2760000	4100000			3291050.129	3124449.574	0.18
Résultat en copies essai 1	2910000	281000	37900	2910000	2810000	3790000			3141083.679		
Résultat en copies essai 2	4340000	212000	55000	4340000	2120000	5500000			3698816.276	Valeur théorique du WHO UI/ml	
Résultat en copies essai 2	5070000	201000	60100	5070000	2010000	6010000			3941784.066	575000	
Résultat en copies essai 3	2530000	209000	28200	2530000	2090000	2820000			2461342.053		
Résultat en copies essai 3	2470000	208000	30700	2470000	2080000	3070000			2507838.438		

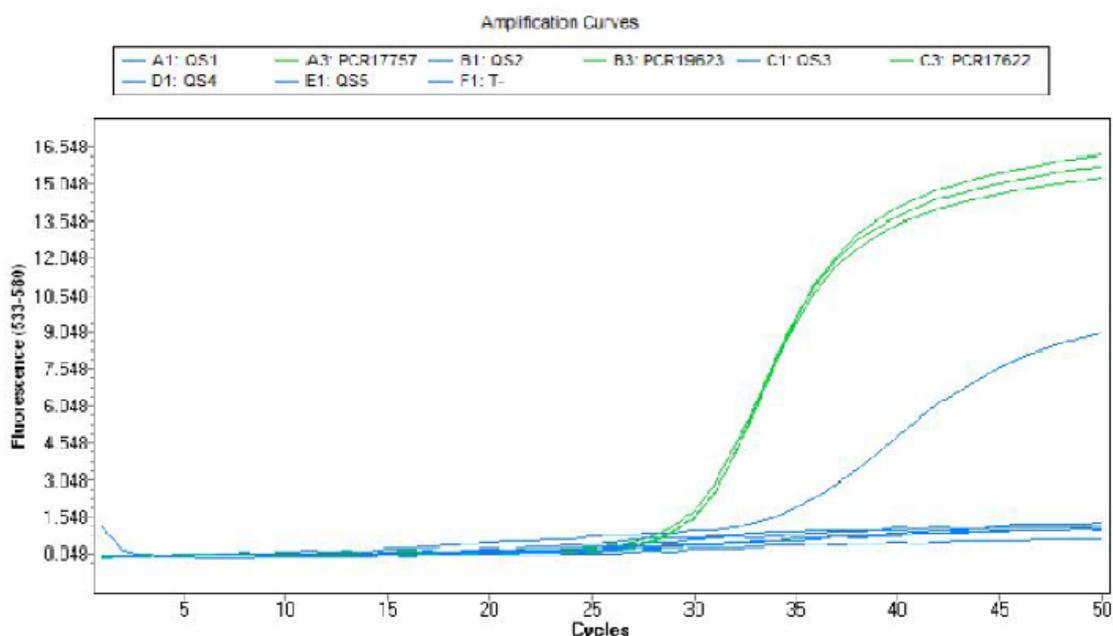
**Figure 30. Calcul du coefficient de corrélation**

Donc, dans le cadre de la validation de méthode de la trousse EurobioPlex qRT-PCR Hépatite Delta, tous les résultats des charges virales du VHD du laboratoire de Virologie de Bordeaux, exprimés en copies/mL, ont été multipliés par 0,18. Cela a permis la comparaison de nos résultats avec les résultats obtenus par le CNR associé Delta (Hôpital Avicenne, Bobigny).

### III.2. Gammes de quantification VHD-QS

Dans cette première étape, ont été testés : les standards (QS1, QS2, QS3, QS4, QS5), un patient avec une charge VHD fortement positive, un patient avec une charge VHD faiblement positive, un patient avec une charge VHD négative ainsi qu'un témoin négatif. Il s'agit d'un exemple car il y a eu d'autres gammes qui ont été faites ensuite.

Les critères d'acceptation pour cette première étape ont été obtenus :  $Ct \leq 38$  pour le contrôle interne RC (**Figure 31**), efficacité  $>90\%$  = pente  $> -3,6$  (**Figure 32**), valeurs de la gamme de quantification VHD-QS respectées (**Tableau 11**).



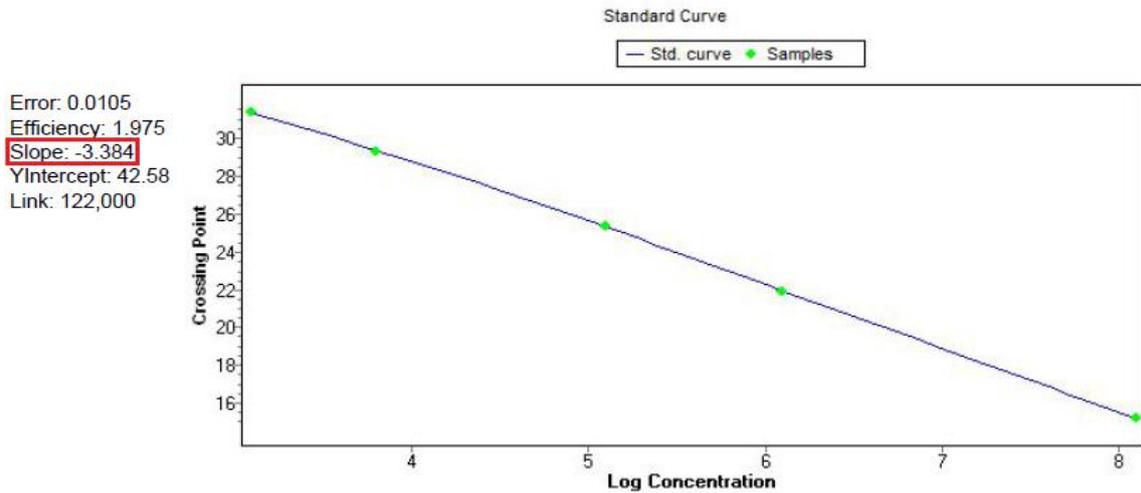
#### Abs Quant/2nd Derivative Max for VHD IC (Abs Quant/2nd Derivative Max)

##### Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	QS1	Unknown	34.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	PCR17757	Unknown	29.80			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	QS2	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	PCR19623	Unknown	29.96			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	QS3	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	PCR17622	Unknown	29.83			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	QS4	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	QS5	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	T-	Unknown				

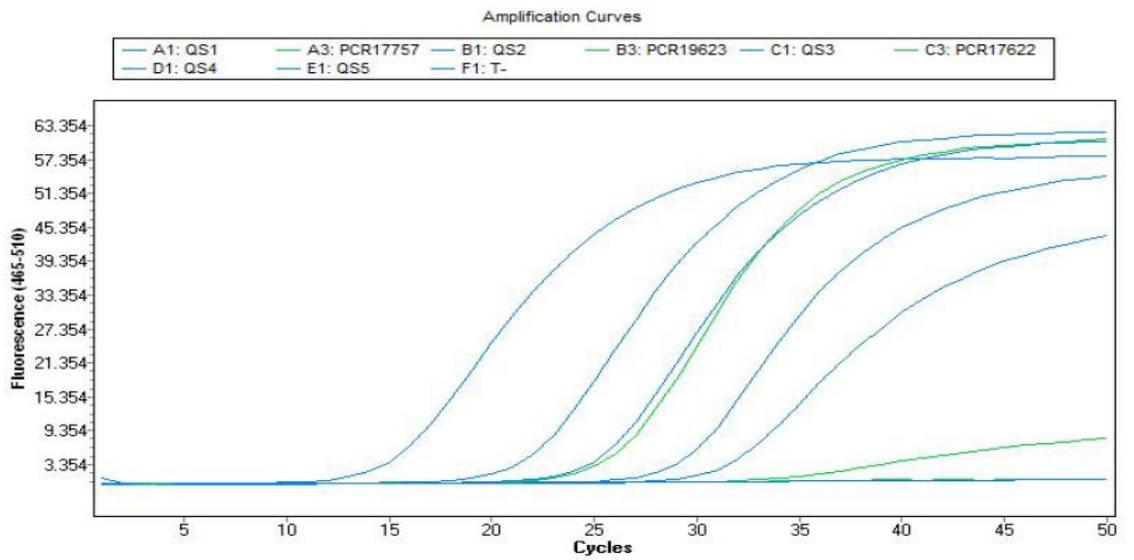
**Figure 31. Analyse du contrôle interne positif RC sur le canal HEX**

Ces résultats montrent la présence du contrôle interne dans les échantillons, ce qui permet la validation des résultats. On a une valeur d'IC pour QS1 car c'est le témoin positif (STD).



**Figure 32. L'efficacité de la PCR sur le canal FAM**

Le virus de l'hépatite Delta est détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM; les amplifications (exprimées en Ct) doivent être visibles sur le canal FAM. La droite a été donc construite avec les valeurs de Ct des QS1-QS5 (15,2 – 21,9 – 25,37 – 29,26 – 31,9).



VHD- QS	Attendu			EurobioPlex VHD qRT-PCR Bordeaux			
	+/-3 Ct FAM	Molécules /10 µl	Copies/mL	Ct	Copies/mL	UI/mL	Log10 UI/mL
QS1	15.8	1 <sup>E</sup> +07	125 000 000	15.2	120 000 000	21 600 000	7.33
QS2	21.8	1 <sup>E</sup> +05	1 250 000	21.9	1 410 000	253 800	5.40

<b>QS3</b>	24.8	1 <sup>E</sup> +04	125 000	25.37	116 000	20 880	4.31
<b>QS4</b>	29.8	5 <sup>E</sup> +02	6 250	29.26	7 160	1 289	3 .11
<b>QS5</b>	31.5	1 <sup>E</sup> +02	1 250	31.39	1 180	212	2.32

**Tableau 11. Comparaison des valeurs de la gamme de quantification VHD-QS**  
(1<sup>er</sup> coffret)

Le mode d'emploi du coffret EurobioPlex qRT-PCR VHD a été adapté par rapport aux automates utilisés au Laboratoire de Virologie de Bordeaux. A la base, le coffret n'était validé que pour l'automate CFX96 Real Time PCR detection System (Biorad) et APPLIED Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem). Dans notre cas, nous avons utilisé l'automate LightCycler 480 ROCHE. De même, le système d'extraction (MagNa Pure Compact) est aussi différent de celui recommandé par le fournisseur du coffret (Abbott m2000sp Système). Donc, les volumes ont été réajustés : 400 µl plasma – 50 µl élution – 10 µl PCR sample avec notre système d'extraction, comparativement aux volumes décrits dans le mode d'emploi du coffret : 500 µl plasma – 110 µl élution – 10 µl PCR sample.

### III.3. Comparaison de méthodes

La comparaison de méthodes a été réalisée en trois manipulations successives. En 1<sup>ère</sup> étape nous avons testé une série de 3 patients, puis en seconde intention 14 patients avec des charges VHD positives, couvrant la fourchette 4.43 Log - 8.05 Log donnée par le laboratoire d'Avicenne. Les 6 derniers patients avec charges VHD positives disponibles dans la sérothèque du CHU de Bordeaux ont été testés dans un troisième run de PCR. (**Tableau 12**)

Malgré une sous-estimation évidente, l'ordre de grandeur de la concentration, exprimée en UI/mL par le CNR et par notre laboratoire, semble comparable.

	EurobioPlex VHD qRT-PCR Avicenne		EurobioPlex VHD qRT-PCR <b>Bordeaux</b>			
	UI/mL	log 10 UI/mL	Ct	Copies/mL	UI/mL	Log 10 UI/mL

Patient 1	53 376 931	7.73	18.58	11 700 000	2 106 000	6.32
Patient 2	112 747 760	8.05	19.92	4 610 000	829 800	5.92
Patient 3	54 864 540	7.74	21.54	1 500 000	270 000	5.43
Patient 4	10 799 084	7.03	21.77	1 280 000	230 400	5.36
Patient 5/STD	26 027 315	7	21.80	1 250 000	225 000	5.35
Patient 6	3 479 757	6.54	22.05	1 050 000	189 000	5.28
Patient 7	3 520 807	6.55	23.12	503 000	90 540	4.96
Patient 8	11 647 620	7.07	23.27	451 000	81 180	4.91
Patient 9	980 141	5.99	23.32	436 000	78 480	4.89
Patient 10	1 552 562	6.19	23.48	390 000	70 200	4.85
Patient 11	121 644	5.09	27.23	29 100	5 238	3.72
Patient 12	18 360	4.26	29.86	4 690	844	2.93
Patient 13	276 451	5.44	29.91	4 530	815	2.91
Patient 14	26 630	4.43	32.8	611	110	2.04
Patient 15	87 964	4.94	30.99	1 960	353	2.55
Patient 16	338 027	5.53	25.62	141 000	25 380	4.40
Patient 17	657 388	5.82	23.47	599 000	107 820	5.03
Patient 18	1 317 703	6.12	23.29	674 000	121 320	5.08
Patient 19	3 234 602	6.51	20.56	4 250 000	765 000	5.88
Patient 20	11 784 932	7.07	20.76	3 710 000	667 800	5.82
Patient 21	1 604 063	6.21	26.17	70 000	12 600	4.10
Patient 22	<1000	<3	33.91	125	23	1.36
Patient 23	<1	<2				

**Tableau 12. Patients avec charges VHD positives testés pour la comparaison de méthode**

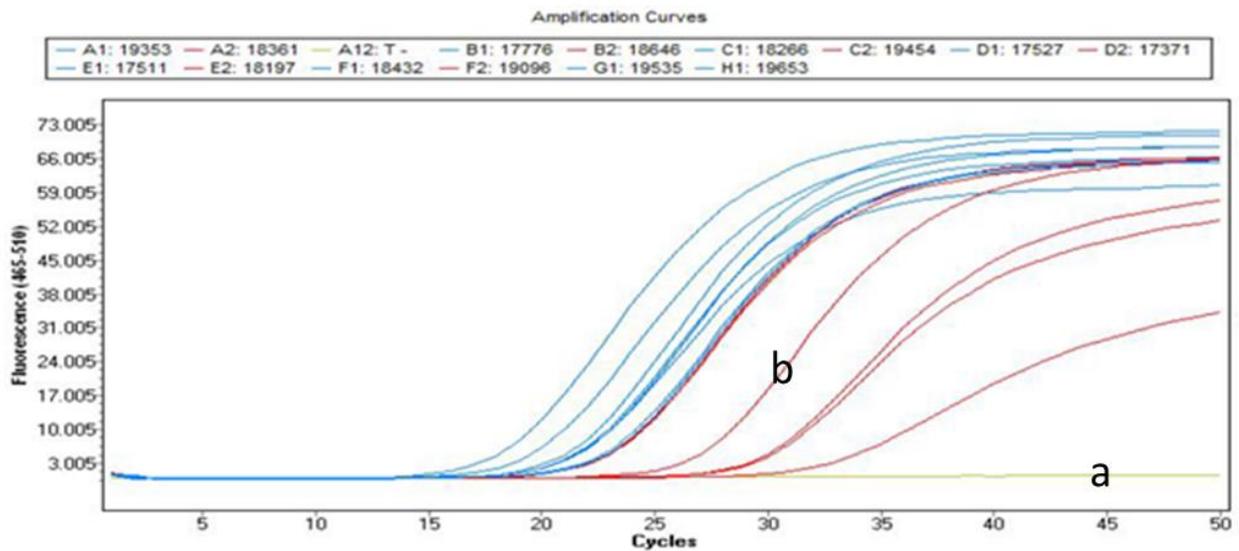


Figure 33. Courbes d'amplification pour la série de 14 patients avec des charges VHD positives : témoin négatif (a), standard (b)

Le premier et le troisième runs ont permis l'obtention de courbes tout aussi satisfaisantes.

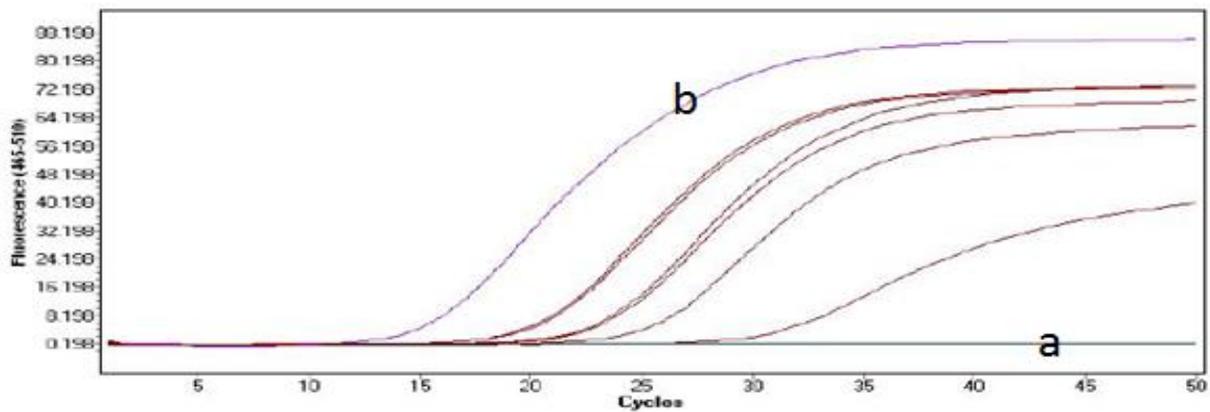
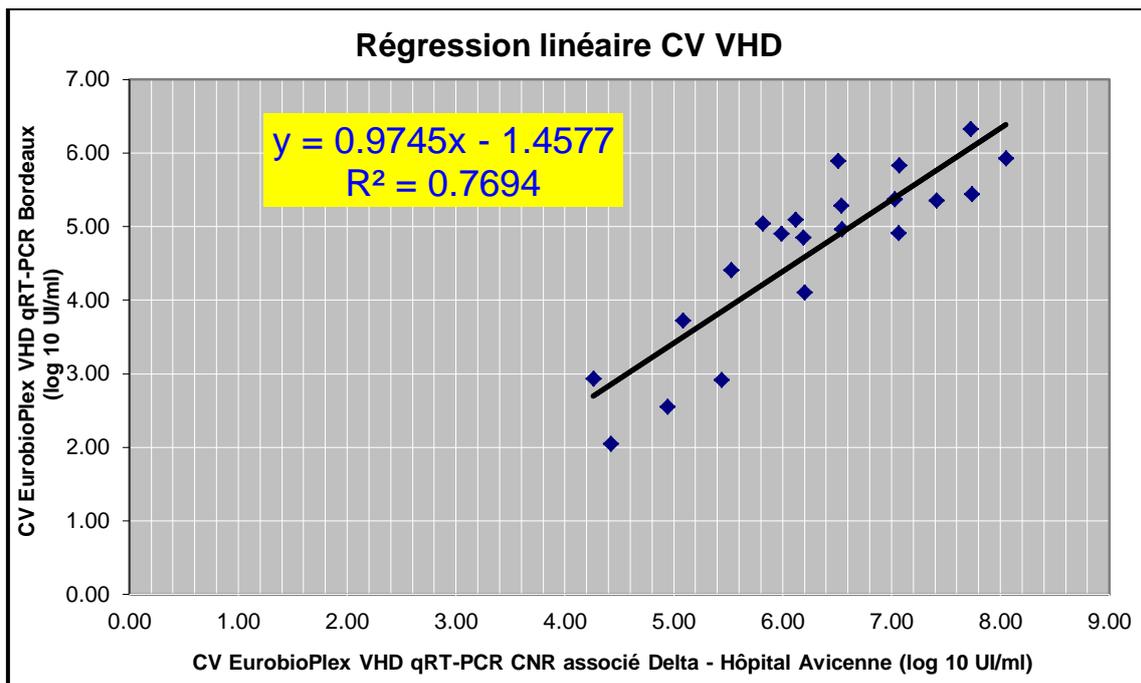


Figure 34. Courbes d'amplification pour la série de 6 patients avec des charges VHD positives : témoin négatif (a), standard (b)

### III.3.1. Courbe de régression linéaire



**Figure 35. Droite de régression linéaire CV VHD EurobioPlex qRT-PCR  
Laboratoire Virologie Bordeaux - CNR associé Delta (Hôpital Avicenne)**

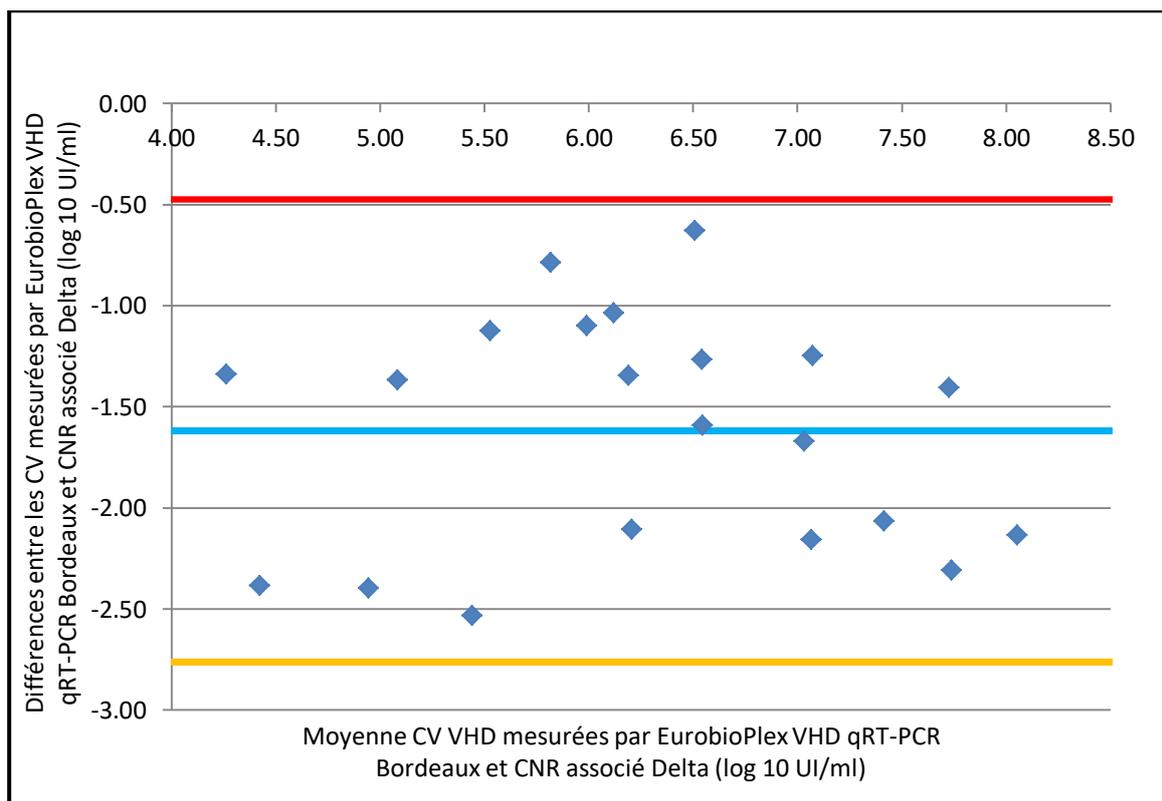
La corrélation entre les résultats de notre laboratoire et ceux du CNR associé Delta a été déterminée par la droite de régression linéaire (**Figure 35**).

Tous les échantillons testés se situent dans la plage dynamique de quantification des deux dosages : plage linéaire de 5.09 à 8.05 log<sub>10</sub> UI/mL pour le CNR associé Delta et de 2.04 à 6.32 log<sub>10</sub> UI/mL pour le laboratoire de Bordeaux. Comme vu sur la droite de régression linéaire, il y a une corrélation positive et significative entre les niveaux d'ARN du VHD obtenus pour les mêmes échantillons avec les deux tests.

Conclusion : la courbe de régression linéaire est conforme.

Conclusion générale: la comparaison de méthode donne une bonne concordance et une bonne corrélation entre les deux dosages.

### III.3.2. Diagramme de Bland-Altman



**Figure 36. Diagramme de Bland-Altman CV VHD EurobioPlex qRT-PCR  
Laboratoire Virologie Bordeaux - CNR associé Delta (Hôpital Avicenne)**

Le diagramme de Bland-Altman (**Figure 36**) montre les niveaux des charges virales VHD testées pour 21 échantillons, par la technique EurobioPlex VHD qRT-PCR utilisée au laboratoire de Bordeaux et celle du CNR associé Delta. On voit ainsi la différence entre les deux dosages en fonction de la moyenne des résultats.

En moyenne, le résultat du test EurobioPlex VHD qRT-PCR de Bordeaux est de 1,62 log<sub>10</sub> UI/mL plus bas que le résultat du test d'Avicenne, avec une charge virale de 35,4 % plus basse. Les valeurs se situent entre -0,47 et -2,76 ET, avec une différence d'écart type de 0,57 entre les deux tests.

Malgré une bonne concordance entre les deux dosages, globalement, les échantillons testés à Bordeaux montrent une sous-estimation des charges virales VHD comparativement à celles du CNR associé Delta.

Conclusion : les résultats sont concordants.

### III.4. Répétabilité

Pour cette étape, la **gamme en 5 points** est refaite, car le numéro de lot du deuxième coffret est différent de celui du premier. Les résultats sont comparables par rapport à la première gamme et les critères d'acceptation obtenus.

**La répétabilité** dépend de facteurs intra-séries (mêmes conditions opératoires et court intervalle de temps entre les répétitions). Il est nécessaire d'avoir des répétitions par niveau pour identifier et quantifier les sources d'erreur.

L'effectif idéal est de 30 mesures, sur minimum deux niveaux : bas et haut. Nous avons donc préparé 15 échantillons à faible charge virale VHD pour la limite basse de quantification et 15 échantillons à forte charge virale VHD pour la limite haute de quantification. Dans les conditions Abbot, le domaine de linéarité de quantification validé est de  $1^{E+02}$  UI/mL à  $1^{E+8,3}$  UI/mL sur échantillon clinique. Mais il faut tenir compte du fait que ce ne sont pas les mêmes conditions au laboratoire de virologie de Bordeaux.

#### III.4.1. Répétabilité niveau bas :

Nous avons choisi le plasma d'un patient ayant la charge VHD la plus faible disponible dans notre sérothèque (4.26 log soit 18 360 UI/mL) et réalisé une dilution au  $40^{\text{ème}}$  avec du plasma négatif, obtenant ainsi 15 échantillons de 400  $\mu$ L. (**Figure 37**)

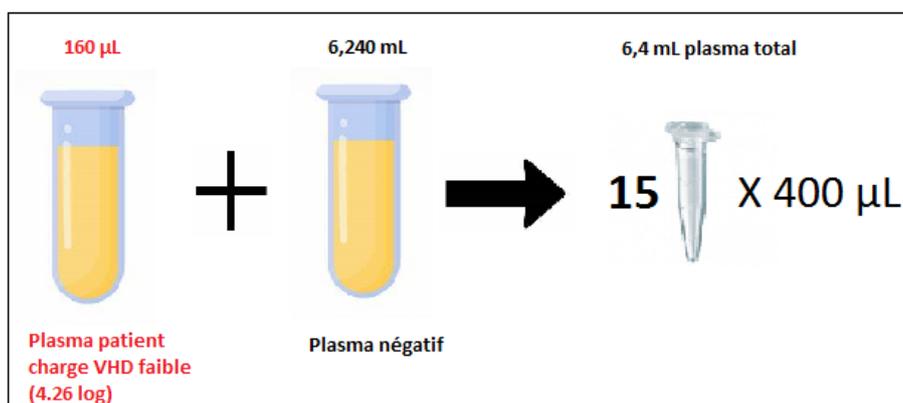
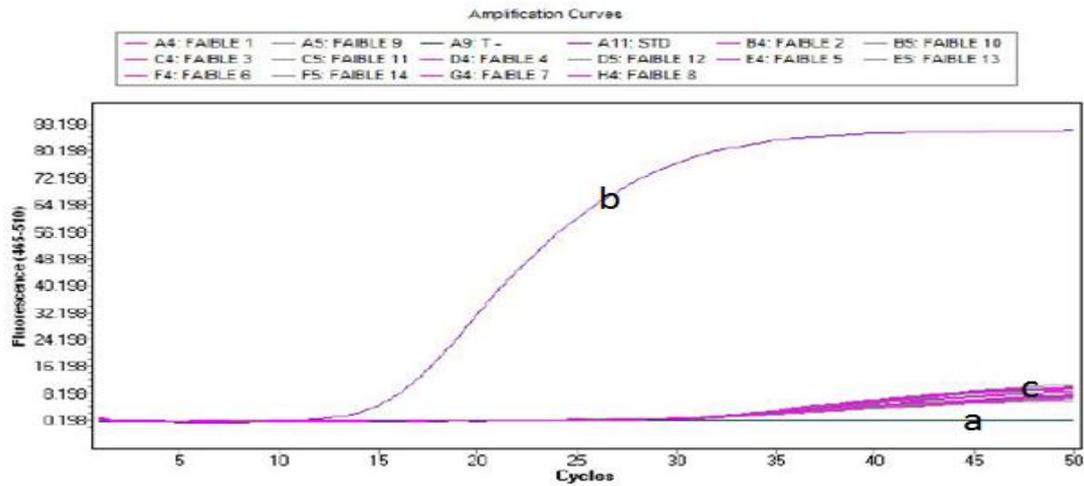


Figure 37A. Réalisation des dilutions pour le niveau bas



**Figure 37B : Courbes d'amplification des échantillons de répétabilité charge faible : témoin négatif (a), standard (b), échantillons (c)**

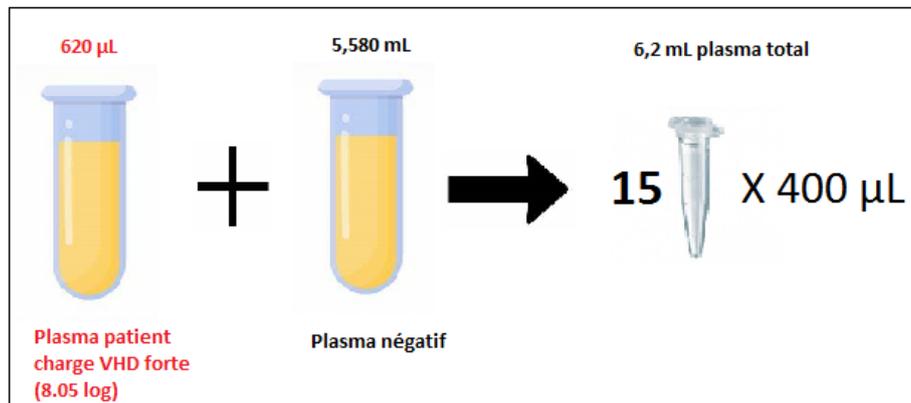
	EurobioPlex VHD qRT-PCR Bordeaux			
	Ct	Copies/mL	UI/mL	log10 UI/mL
Dilution FAIBLE 1	31.52	1 210	218	2.34
Dilution FAIBLE 2	31.61	1 110	200	2.30
Dilution FAIBLE 3	31.09	1 790	322	2.51
Dilution FAIBLE 4	31.40	1 350	243	2.39
Dilution FAIBLE 5	31.74	984	177	2.25
Dilution FAIBLE 6				
Dilution FAIBLE 7	31.81	921	166	2.22
Dilution FAIBLE 8	31.83	905	163	2.21
Dilution FAIBLE 9	31.21	1 600	288	2.46
Dilution FAIBLE 10	31.78	948	171	2.23
Dilution FAIBLE 11	31.42	1 320	238	2.38
Dilution FAIBLE 12	31.49	1 240	223	2.35
Dilution FAIBLE 13	31.83	903	163	2.21
Dilution FAIBLE 14	31.54	1 190	214	2.33

Dilution FAIBLE 15	31.92	691	124	2.09
--------------------	-------	-----	-----	------

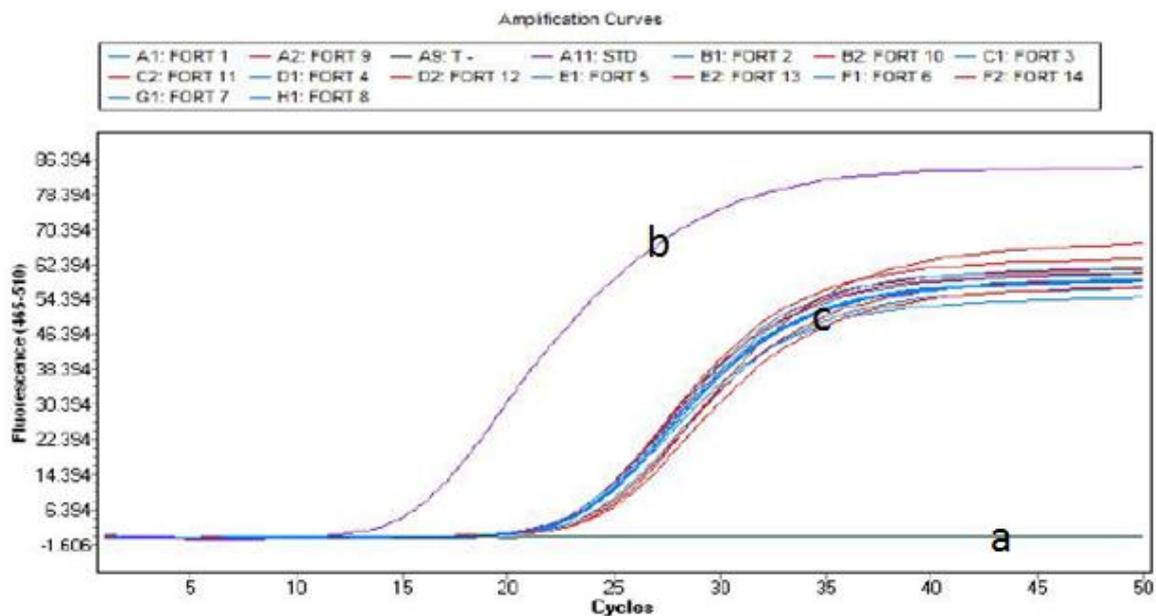
**Tableau 13. Résultats numériques obtenus pour les 15 échantillons à faible charge virale VHD testés pour la répétabilité**

### III.4.2. Répétabilité niveau haut :

Nous avons utilisé le plasma du patient avec la plus forte charge VHD (8.05 log soit 112 747 760 UI/mL), en faisant une dilution au 10<sup>ème</sup>, comme dans la **Figure 38**.



**Figure 38A. Réalisation des dilutions pour le niveau haut**



**Figure 38B : Courbes d'amplification des échantillons de répétabilité charge forte : témoin négatif (a), standard (b), échantillons (c)**

	EurobioPlex VHD qRT-PCR <b>Bordeaux</b>			
	Ct	Copies/mL	UI/mL	log 10 UI/mL
Dilution FORTE 1	23.22	710 000	127 800	5.11
Dilution FORTE 2	23.89	452 000	81 360	4.91
Dilution FORTE 3	23.26	690 000	124 200	5.09
Dilution FORTE 4	23.37	641 000	115 380	5.06
Dilution FORTE 5	23.48	596 000	107 280	5.03
Dilution FORTE 6	23.37	641 000	115 380	5.06
Dilution FORTE 7	23.25	696 000	125 280	5.10
Dilution FORTE 8	23.55	566 000	101 880	5.01
Dilution FORTE 9	24.05	405 000	72 900	4.86
Dilution FORTE 10	24.53	294 000	52 920	4.72
Dilution FORTE 11	23.28	682 000	122 760	5.09
Dilution FORTE 12	24.56	288 000	51 840	4.71
Dilution FORTE 13	23.23	702 000	126 360	5.10
Dilution FORTE 14	23.29	676 000	121 680	5.09
Dilution FORTE 15	23.22	595 000	107 100	5.03

**Tableau 14. Résultats numériques obtenus pour les 15 échantillons à forte charge virale VHD testés pour la répétabilité**

Conclusion :

Les charges virales mesurées lors des tests de répétabilité sont présentées ci-dessous en UI/mL puis en log<sub>10</sub> UI/mL. Selon le Quamic, l'exigence requise est un **écart type < 0.25 logUI/mL**. Un **coefficient de variation inférieur à 5%** est par ailleurs satisfaisant (**Tableau 15**).

Concentration	Niveau Haut log 10 UI/mL	Niveau Bas Log 10 UI/mL
Moyenne	5.00	2.30
Ecart-type	0.134	0.110
Coefficient de Variation	2.67%	4.78%
Nombre de tests	15	14

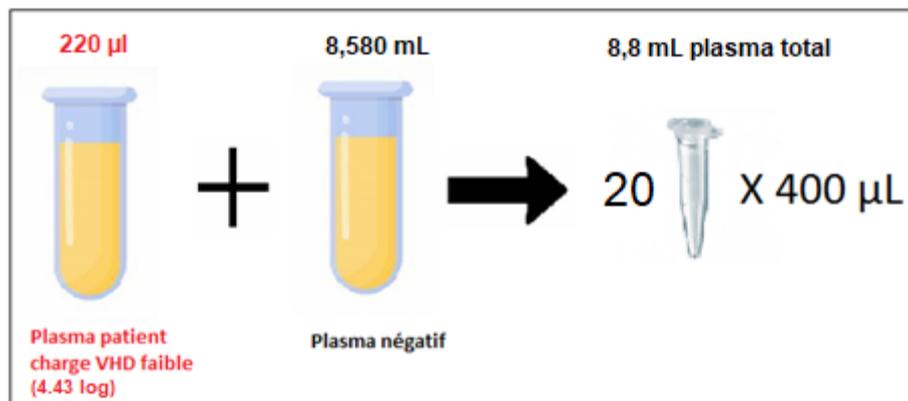
**Tableau 15. Résultats conformité des tests de répétabilité**

Ces résultats sont conformes, tant pour le niveau haut que pour le niveau bas.

### III.5. Reproductibilité

L'étude de la reproductibilité sera réalisée de façon prospective, dès l'installation de la technique au laboratoire. L'effectif idéal est de 30 mesures avec au moins deux niveaux, sur 15 jours différents, dans des séries différentes.

Nous avons choisi du plasma avec une charge VHD faiblement positive (4.43 log soit 26 630 UI/mL) et du plasma avec une charge VHD fortement positive (7.03 log soit 10 799 084 UI/mL). Des dilutions au 40<sup>ème</sup> avec du plasma négatif ont été réalisées, permettant l'obtention de 20 échantillons de 400 µL pour chaque niveau. (**Figure 39 et Figure 40**)



**Figure 39. Réalisation des dilutions de faible charge positive**

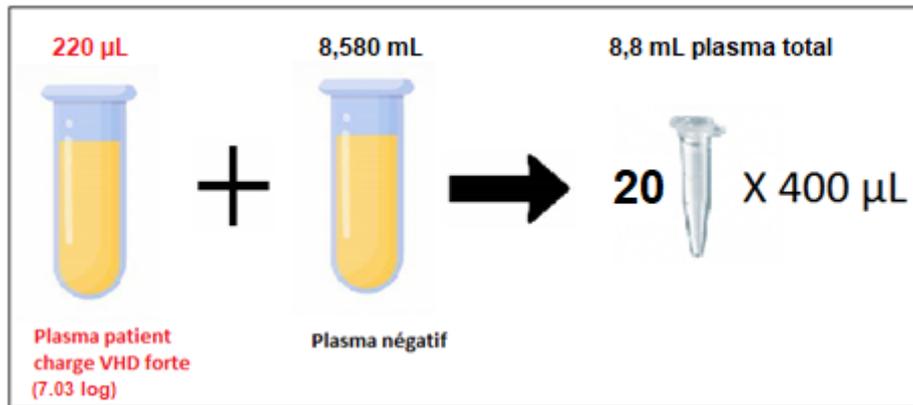


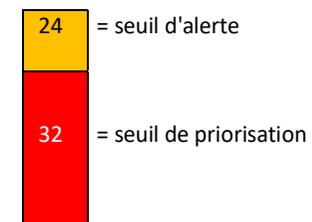
Figure 40. Réalisation des dilutions de forte charge positive

### III.6. Analyse de risques

Les prélèvements arrivent à l'ABC, où les analyses sont enregistrées et les tubes étiquetés. Ensuite, les tubes sont dirigés vers la chaîne PABIM, où ils sont centrifugés pour qu'ils arrivent, dans une dernière étape, sur PTBM pour la réalisation de la PCR.

Champ d'analyse (pratique, processus, équipement)	Entité concernée	Date
PCR VHD	PTBM	octobre 2019

Gravité G	Fréquence F	Délectabilité D
<u>1 - MINEUR</u> : Impact minime, pas d'impact sur le résultat	<u>1 - EXCEPTIONNEL</u> <1/an, 1/10 000	<u>1 - INMANQUABLE</u>
<u>2 - MODERE</u> : Impact sur le travail du laboratoire, mais pas sur le résultat	<u>2 - RARE</u> : <1/trimestre, <1/1000	<u>2 - FACILE</u> moyen de détection simple et systématique
<u>3 - SIGNIFICATIF</u> : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat mais pas la prise en charge du patient	<u>3 - PEU FREQUENT</u> <1/mois, <1/500	<u>3 - ALEATOIRE</u> moyen de détection simple mais sporadique
<u>4 - IMPORTANT</u> : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat et sans conséquence grave pour le patient	<u>4 - FREQUENT</u> <1/semaine, <1/100	<u>4 - DIFFICILE</u> moyen de détection difficile et sporadique



<u>5 - MAJEUR</u> : Impact majeur sur la prise en charge du patient	<u>5 - TRES FREQUENT</u> <1/jour, <1/10	<u>5 – INDETECTABLE</u>
---	---	-------------------------

Etape	Elément défaillant	Risque / événement redouté / mode de défaillance (AMDEC)	Causes (F)	Effets (G)	G	F	D	ICR	Moyens de maîtrise existants (D)
<b>Température et délai de conservation préanalytiques</b>	Matière	Conservation plus de 6h à température ambiante ou 4°C  Altération de l'ARN intra-extra-cellulaire	Lyse cellulaire et libération enzymatique	Modification de la valeur de la charge virale	3	3	2	18	- Information du service clinique sur les conditions de prélèvement (catalogue des actes de biologie)  - Respect des consignes de stockage aux ABC  - Congélation rapide à l'arrivée sur le PTBM
<b>Mauvais conditionnement du prélèvement</b>	Matériel	Prélèvement vidé dans la pochette, tube non adapté à l'analyse (tube hépariné, tube borate, tube citrate, tube sec, écouvillon sec, etc)  Impossibilité de réaliser l'analyse	Contenant non hermétique ou mal fermé	Impossibilité de rendre le résultat	5	1	1	5	- Information du service clinique sur le contenant et son utilisation  - Récupérer si possible du prélèvement dans le service préleveur ou un autre laboratoire ou faire reprélever si possible
<b>Mauvaise manipulation du prélèvement</b>	Main d'œuvre	Tube renversé  Impossibilité de réaliser l'analyse	Inattention	Impossibilité de rendre le résultat	5	1	1	5	- Contacter le service  - Récupérer si possible du prélèvement dans le service préleveur ou un autre laboratoire ou faire reprélever si possible
	Main d'œuvre	Erreur d'identification de l'échantillon	Inattention	Résultat erroné	5	1	2	10	-Vérifier la concordance

		Mauvaise attribution du résultat							flacon/demande dans le service préleveur, à l'ABC et au laboratoire
<b>Anomalie concernant le contenu</b>	Matière Main d'œuvre	Volume insuffisant ou aspect anormal (laqué, hémolysé)  Quantité de prélèvement insuffisante pour réaliser l'extraction des acides nucléiques	Erreur préleveur, difficulté de prélèvement (pédiatrie, problèmes veineux)	Impossibilité de réaliser l'analyse	5	1	1	5	- Information du service clinique sur le volume nécessaire  - Demande d'un nouveau prélèvement
<b>Anomalie de centrifugation</b>	Main d'œuvre Méthode	Absence d'orientation vers la chaîne PABIM  Panne de centrifugeuse	Inattention  Souci matériel technique	Retard du rendu des analyses	5	1	1	5	
<b>Anomalies dues à la qualité intrinsèque des réactifs</b>	Milieu Main d'œuvre	Non maîtrise de la température pendant le transport des réactifs au laboratoire ou dans les zones de stockage  Réactifs détériorés, mal conservés  Congélation-décongélation fréquente du réactif → détérioration du contrôle interne ou des standards	Surveillance métrologique	Résultats ininterprétables ou erronés	5	1	2	10	- Alerte auprès du fournisseur pour vérification auprès des transporteurs  - Contrôle de la température des locaux par des méthodes adaptées (relevé quotidien des températures)  - Stockage conforme aux spécifications des fournisseurs
	Méthode	Anomalie de la qualité des lots  Retard dans l'exécution de l'analyse	Problème fournisseur	Impossibilité de rendre le résultat dans le délai prévu	2	1	2	4	- appel fournisseur et remplacement réactif
<b>Anomalies dues à la gestion des réactifs</b>	Méthode	Réactifs périmés, stock insuffisant  Retard dans l'exécution de l'analyse	Mauvaise gestion des stocks	Impossibilité de rendre le résultat dans le délai prévu	2	1	1	2	- Gestion des stocks  - Commande en urgence
<b>Enregistrement</b>	Main d'oeuvre	Erreur enregistrement  L'analyse n'apparaît pas sur la liste de travail	Erreur d'enregistrement à l'ABC, problème	Analyse non réalisée, réalisation d'analyses non	2	1	2	4	- Information de l'ABC  - Vérification des feuilles de

			glims	demandées					prescription
<b>Préparation de l'extraction MagnaPure Compact</b>	Main d'oeuvre	Non enregistrement d'une analyse, problème informatique	erreur de prescription ou d'enregistrement ABC	oubli de prélèvements, réalisation d'analyses non prescrites	3	3	3	27	Vérification (non systématique) des feuilles de prescription, édition des non terminés
	Main d'oeuvre	Echantillon précieux non pris en charge	Inattention lors du dépôt manuel	Résultat erroné ou attribué à un mauvais patient	5	2	4	40	Impression du rapport d'erreurs Rigueur et concentration
	Main d'oeuvre	Vérification de l'identité patient, étiquetage et aliquotage du tube archive	inattention	erreur d'identité du patient sur le tube archive	2	2	5	20	Rigueur et organisation
	Main d'oeuvre	Mauvais contrôle des échantillons exclus	Inattention	Non prise en charge de ces échantillons, retard au rendu des résultats	1	2	1	2	Rigueur et organisation
<b>Extraction sur MagnaPure Compact</b>	Main d'oeuvre	Chargement des réactifs sur <b>MagnaPure Compact</b>  Mauvais positionnement des réactifs et consommables  Mauvais programme	inattention	Retard à l'exécution de l'extraction	1	1	1	1	Rigueur  Signalé par l'appareil
<b>Préparation des mélanges réactionnels</b>	Main d'oeuvre	Décongélation des réactifs sur un portoir bien organisé  Mauvais calcul mix	inattention	échec d'amplification, retard au rendu des résultats	5	2	1	10	Respect des consignes de décongélation de EurobioPlex  Rigueur et organisation
	Main d'oeuvre	Vérification des lots de réactifs	inattention	erreur de quantification, résultats	1	2	1	2	Rigueur et organisation

		Omission de vérification		erronés					
<b>Préparation de la gamme</b>	Main d'oeuvre	Dilution en cascade	inattention	erreur de quantification, retard du rendu des résultats	5	2	1	2	Rigueur et organisation
<b>Dépot</b>	Main d'oeuvre	Mix, patient	Inattention, inversion	erreur de quantification, résultats erronés	5	2	1	2	Rigueur et organisation
<b>Lancement de la PCR sur Light Cycler 480 ROCHE</b>	Main d'oeuvre	Ouverture du logiciel Mauvais programme PCR	inattention	Absence de démarrage de la PCR	1	1	1	1	Rester devant l'appareil jusqu'au démarrage de la PCR
<b>Lecture des résultats et validation technique</b>	Main d'oeuvre	Contrôle IC Non prise en compte d'un IC négatif	inattention	résultat erroné	2	5	2	20	Rigueur, vérification lors de la validation biologiste devant l'écran Flow server
	Main d'oeuvre	Calcul des charges avec la mauvaise gamme (mauvais lot),	inattention	résultat erroné	2	2	2	8	A vérifier de façon prospective
<b>Préparation de la série suivante</b>	Main d'oeuvre	Recherche des non terminés Oubli	inattention	résultats en attente	4	2	2	16	Rigueur
<b>validation biologique</b>	<b>Main d'oeuvre</b>	<b>Vérification des résultats sur impression papier oubli de vérification des IC, de la valeur standard</b>	<b>inattention</b>	<b>résultats erronés</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>32</b>	<b>Confrontation aux antécédents et dossier clinique si besoin</b>

Tableau 16. Analyse de risque détaillée

## IV. Cas cliniques

### Recueil des données

Le recueil des données biologiques a été effectué sur SYNERGY® et GLIMS®, les systèmes de gestion d'information du laboratoire du CHU de Bordeaux. Les sérologies VHB, VHD, VIH, VHC, les charges virales et les paramètres biochimiques ont été récupérés.

Les renseignements cliniques et thérapeutiques ont été obtenus à partir des données du logiciel médical DXCare® : données démographiques, contexte clinique, mode de transmission du virus, éventuelles coinfections, examens d'imagerie, prise en charge thérapeutique proposée.

### Cas clinique 1 :

Patiente de 39 ans, d'origine bulgare, examinée en mai 2018 par le service d'Hépatogastroentérologie. Le bilan hépatique réalisé le 18/05/2018 montre :

- l'absence de cytolysse hépatique
- une sérologie VHB en faveur d'une hépatite B chronique inactive :
  - Ag HBs positif
  - Ac anti-HBs négatifs
  - Ac anti-HBc positifs
  - ADN VHB indétectable

Dans ce contexte, la recherche de l'ARN VHD est réalisée, qui retrouve une forte répllication virale (112 747 760 UI/mL Avicenne). Le résultat de la sérologie VHD, probablement réalisée en ville, n'est pas indiqué dans le dossier.

Par ailleurs, les Ac anti-VHC sont négatifs.

L'échographie abdominale montre un parenchyme hépatique hétérogène pouvant faire évoquer la présence de nodules de régénération.

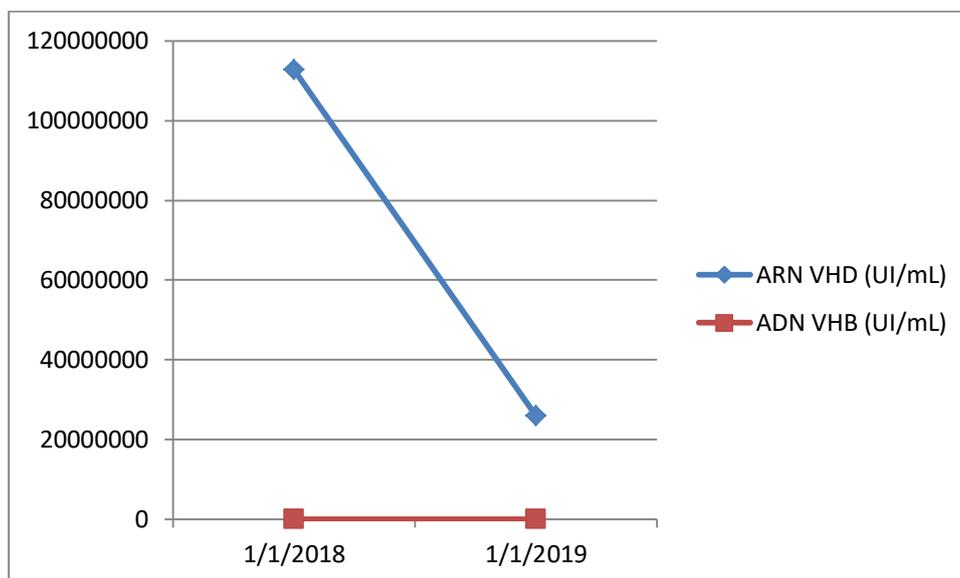
Le fibroscan montre une fibrose modérée (médiane 6,4 kPa, QR 0,4). (*Boursier J et al. Hepatology*)

Le score FIB-4 reste dans les limites de la normale : 0,83 (VR <2.67).

Aucun traitement n'est mentionné sur DxCare.

Après un an, la charge VHD, même si elle diminue légèrement, est toujours élevée : 25 939 273 UI/mL. L'ADN VHB reste indétectable.

CV	18/05/2018	09/09/2019
ARN VHD (UI/mL)	112 747 760	25 939 273
ADN VHB (UI/mL)	indétectable	indétectable



### **Cas clinique 2 :**

Patiente de 53 ans, vue en consultation en avril 2017 pour l'exploration d'une cytolyse hépatique modérée (3 fois la normale), dans un contexte de toxicomanie.

La triple infection VIH-VHC-VHB a été découverte en même temps en raison du contexte de toxicomanie. Le traitement a été instauré immédiatement.

Un bilan virologique est réalisé le 03/04/2017 :

- Ag HBs positif
- Ac anti-HBs négatifs
- Ac anti-HBc positifs
- Ag HBe négatif
- Ac anti-HBe positifs
- ADN VHB indétectable
  
- Ac anti-VIH1 positifs
- ARN VIH indétectable

- Ac anti-VHC positifs
- ARN VHC indétectable

Ensuite, une sérologie VHD est réalisée, ainsi que la recherche de l'ARN VHD :

- Ac IgM anti-VHD positifs
- Ac totaux anti-VHD positifs
- ARN VHD détectable (forte répllication virale → 1 321 187 248 UI/mL)

Les résultats montrent donc une coinfection VIH1-VHC-VHB avec surinfection Delta active.

A l'échographie hépatique, le foie apparait discrètement dysmorphique, sans lésion focale suspecte et sans signe d'hypertension portale.

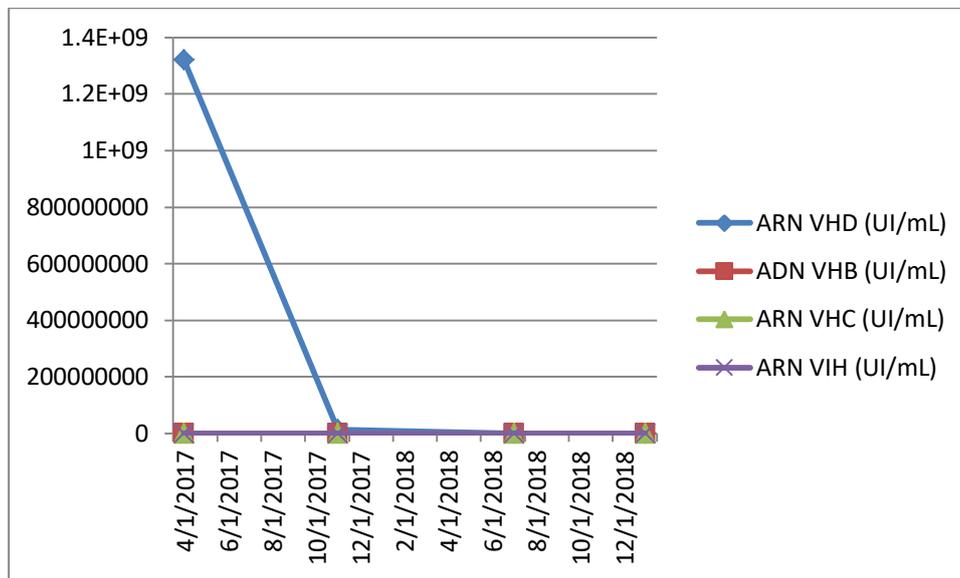
Le fibroscan montre une fibrose sévère (médiane 10,4 KPa; QR 0,8).

La ponction biopsie hépatique retrouve une dysplasie hépatocytaire à grandes cellules, justifiant une surveillance étroite pour dépister un CHC.

Dans ce contexte, un traitement par **Truvada®**, **Isentress®**, **Viread®** et **Combivir®** et **Pegasys®** est instauré dans le courant de l'année 2017.

Au fil du temps, on observe une diminution de la charge VHD par rapport aux bilans précédents. Les charges VIH, VHC et VHB restent indétectables.

CV	03/04/2017	03/11/2017	13/07/2018	23/01/2019
ARN VHD (UI/mL)	1 321 187 248	12 486 722	276 451	18 360
ADN VHB (UI/mL)	indétectable	indétectable	indétectable	indétectable
ARN VHC (UI/mL)	indétectable	indétectable	indétectable	indétectable
ARN VIH (UI/mL)	indétectable	indétectable	indétectable	indétectable



En 2019, il lui a été proposé un antiviral anti hépatite delta mise à disposition en fin d'année 2019, le **Bulevirtide®**, dans le cadre d'une ATU.

### **Cas clinique 3 :**

Patient de 19 ans, originaire du Cameroun, examiné en janvier 2018 par le service d'Hépatogastroentérologie. Son bilan hépatique du 5/01/2018 est en faveur d'une hépatite B chronique active :

- Ag HBs positif
- Ac anti-HBs négatifs
- Ac anti-HBc positifs
- Ag HBe négatif
- Ac anti-HBe positif
- ADN VHB détectable (44 UI/mL)

➔ Cytolyse hépatique : 4 fois la normale

La sérologie VHD retrouve des Ac IgM anti-VHD et Ac totaux anti-VHD positifs. La recherche de l'ARN VHD montre une répllication virale (657 388 UI/mL).

Il n'y a pas d'infection par le VIH ou VHC.

Une échographie abdominale est réalisée en externe mais les résultats ne sont pas indiqués dans le dossier.

Le fibroscan montre une fibrose sévère (médiane 10,7 KPa; QR 0,8).

La ponction biopsie hépatique réalisée en ambulatoire montre une fibrose portale ébauchant quelques septa et de rares foyers de dysplasie à grandes cellules.

Un traitement par **Viread®** est initié le 21/03/2018. Toutefois, une thérapie par **Bulevirtide®** 2 mg/jour en sous cutané est initié le 8/10/2019 dans le cadre de l'ATU.

On n'a pas d'autre charge VHD, ce patient étant probablement suivi en ville.

#### **Cas clinique 4 :**

Patient de 35 ans, d'origine bulgare, toxicomane, vu pour la première fois en consultation en février 2013.

L'examen clinique met en évidence des adénopathies multiples au niveau axillaire, cervical et inguinal de manière bilatérale. Il existe une hépatomégalie avec hépatalgie.

Le bilan hépatique réalisé le 20/02/2013, avec une cytolyse à 3 fois la normale, est en faveur d'une coinfection VIH-VHC-VHB :

- Ac anti-VHC positifs
- ARN VHC indétectable
  
- Ac anti-VIH1 positifs
- ARN VIH détectable (284 300 copies/mL)
  
- Ag HBs positif
- Ac anti-HBs négatifs
- Ac anti-HBc positifs
- Ag HBe négatif
- Ac anti-HBe positif
- ADN VHB détectable (281 UI/ml)

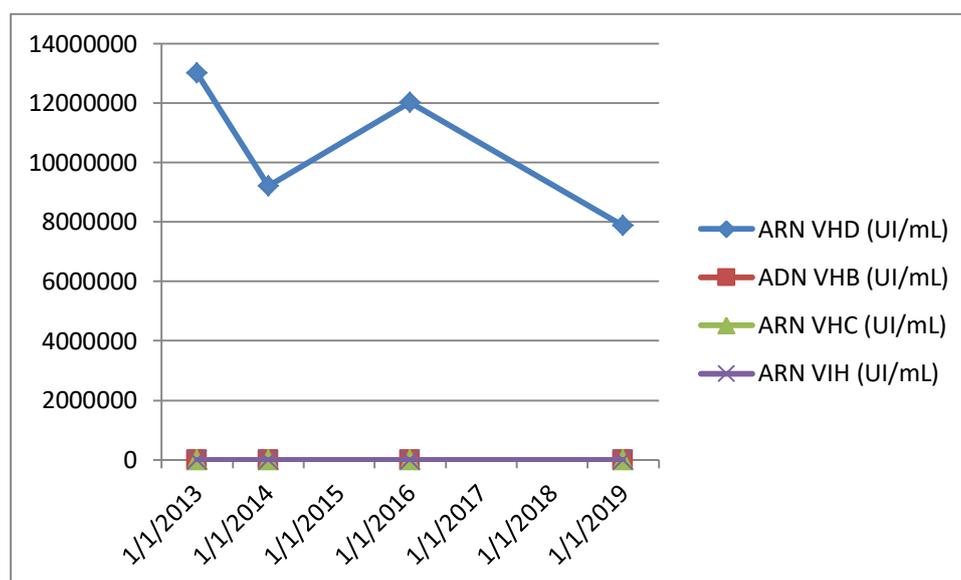
Une sérologie VHD est réalisée, retrouvant des Ac IgM anti-VHD et Ac totaux anti-VHD positifs. La recherche de l'ARN VHD montre une forte réplication virale (13 000 000 UI/mL).

Le fibroscan est en faveur d'une fibrose minime (médiane 5,2 KPa; QR 0,6).

Un traitement par **Truvada®**, **Viread®**, **Eviplera®** est initié immédiatement. Le traitement par **Pegasys®** (stylo 180 micro-grammes, 1 inj/semaine) est initié un an après, le 05/12/2014. Devant une non-réponse et une mauvaise tolérance, le Pegasys® est stoppé neuf mois après (le 25/09/2015). Depuis 2015, le patient n'a pas eu d'autre traitement contre le VHD.

Dans ce contexte, la charge VHD a toujours été élevée. Les charges VIH, VHB et VIH reviennent indétectables.

CV	20/02/2013	05/12/2014	18/03/2016	13/09/2019
ARN VHD (UI/mL)	13 000 000	9 203 245	12 013 565	7 883 463
ADN VHB (UI/mL)	281	indétectable	indétectable	indétectable
ARN VHC (UI/mL)	indétectable	indétectable	indétectable	indétectable
ARN VIH (UI/mL)	284 300	indétectable	indétectable	indétectable



En 2019, il lui a été proposé un antiviral anti hépatite delta mise à disposition en fin d'année 2019, le **Bulevirtide®**, dans le cadre d'une ATU.

## **Cas clinique 5 :**

Patiente de 36 ans, d'origine bulgare, dans un contexte d'accouchement, est vue pour la première fois en France par le service d'Hépatogastro-entérologie, en mai 2016, pour une hépatite chronique virale B connue mais jamais explorée.

Elle a été diagnostiquée à l'âge de 14 ans en Bulgarie. Elle est asymptomatique lors de la consultation.

A noter que sa mère est elle-même porteuse d'une hépatite B.

Le bilan hépatique réalisé le 30/05/2016 met en évidence une hépatite chronique virale B à virus mutant pré C en forme active :

- Cytolyse hépatique modérée
- - Ag HBs : positif
  - Ac anti-HBs : négatifs
  - Ac anti-HBc : positifs
  - ADN VHB : détectable (217 000 UI/ml)

Une sérologie VHD est réalisée aussi, retrouvant des Ac IgM anti-VHD et Ac totaux anti-VHD positifs. La recherche de l'ARN VHD montre une répllication virale (4 245 848 UI/mL).

Les Ac anti-VHC et les Ac anti-VIH sont négatifs.

Le score FIB-4 reste dans les limites de la normale : 2,32 (VR <2,67)

Le FibroScan est en faveur d'une fibrose sévère et possible cirrhose (médiane 16,6 KPa; QR 1,2).

L'échographie abdominale montre un foie de taille légèrement augmentée d'échostructure finement granitée sans stéatose, avec des contours légèrement bosselés. Il n'existe pas de dysmorphie importante, ni nodule suspect, ni hypertension évidente.

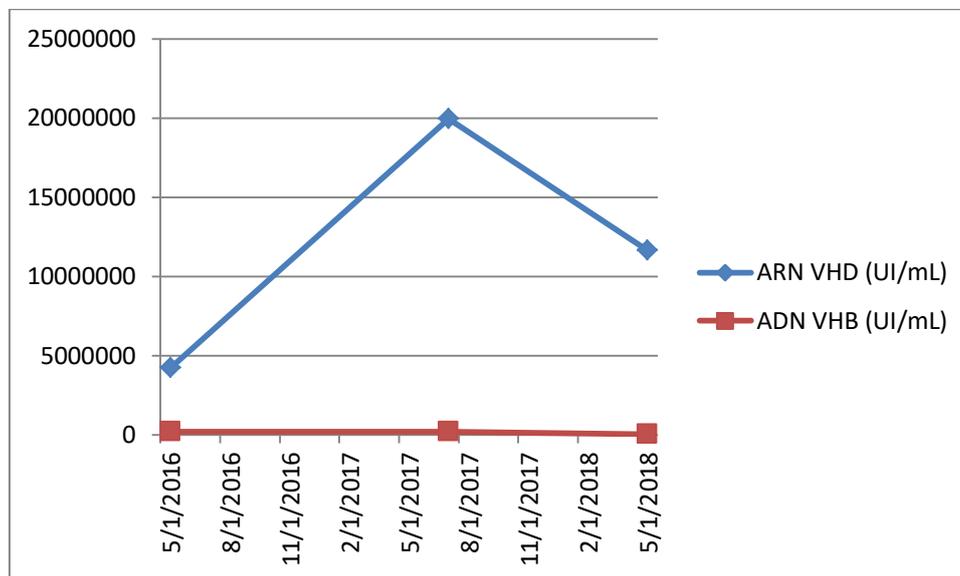
Par ailleurs, une sérovaccination VHB du bébé à la naissance a été réalisée.

Etant au stade de cirrhose, une surveillance étroite est envisagée pour dépister un éventuel CHC.

Le traitement par **Viread®** et **Pegasys®** a été initié le 3/10/2017, après l'arrêt de l'allaitement du bébé. Le Pegasys® a été arrêté en mars 2019.

Après un an, les charges VHD et VHB étaient toujours élevées, avec un doute sur l'observance. Si amélioration de l'observance, un traitement par **Bulevirtide®** pourra être proposé.

CV	30/05/2016	17/07/2017	22/05/2018
ARN VHD (UI/mL)	4 245 848	19 957 772	11 647 620
ADN VHB (UI/mL)	217 000	187 000	33 200



### **Cas clinique 6 :**

Patient de 34 ans, hospitalisé en octobre 2016 pour une décompensation oedémato-ascitique d'une cirrhose. Il est connu pour une infection chronique par le VHB avec coinfection VHD, découverte lors d'un bilan d'incorporation militaire.

Au vu des antécédents familiaux, il y a une forte suspicion d'une contamination materno-fœtale.

Le patient a toujours eu les transaminases à 2 fois la normale.

Les résultats des charges virales réalisées le 6/10/2016 sont les suivants :

→ ADN VHB : détectable (734 UI/mL)

→ ARN VHD : détectable (> 10 000 000 UI/mL)

A l'échographie abdominale, le foie a un aspect cirrhotique, hétérogène, multinodulaire.

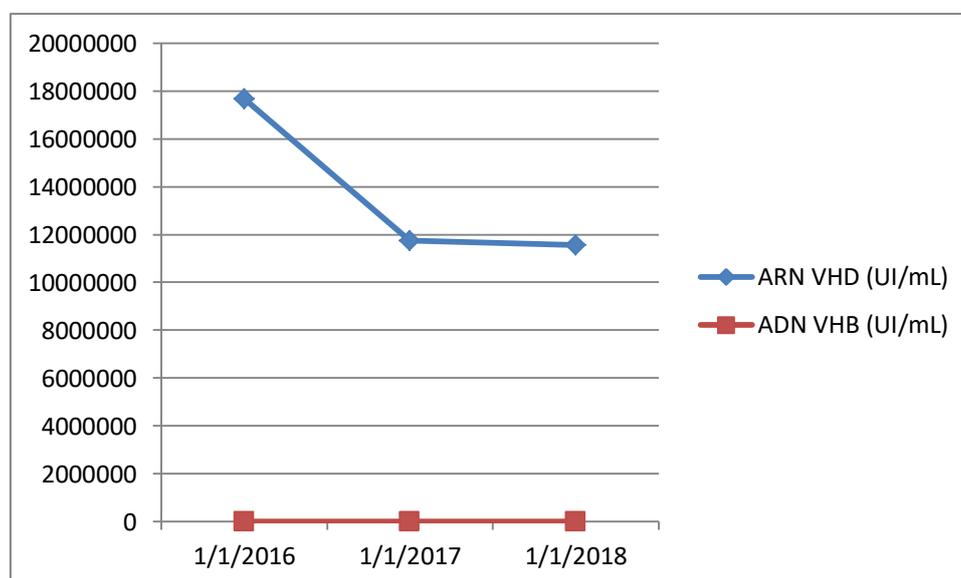
L'IRM montre de multiples nodules régénératifs et dysplasiques et une hypertension portale avec splénomégalie mais pas de lésion suspecte de CHC. Il existe de multiples

adénomégales du hile hépatique et coeliaque globalement stables, tout au long de la surveillance (2 ans).

Le fibroscan est en faveur d'une d'une cirrhose (médiane 12,8 KPa; QR 0,4).

Un traitement par **Pegasys®** et **Viread®** est instauré immédiatement. Malgré les différentes cures de Pegasys® (2016-2018), une CV élevée persiste pour le VHD (avec une charge indétectable pour le VHB). En même temps, à cause d'une tolérance biologique moyenne avec neutropénie, les doses de Pegasys® ont été diminuées.

CV	06/10/2016	12/10/2017	18/10/2018
ARN VHD (UI/mL)	17 665 555	11 739 629	11 552 562
ADN VHB (UI/mL)	734	indétectable	indétectable



Depuis 2018, le patient a été perdu de vue. Toutefois, en cas de nouvel échec, un traitement par **Bulevirtide®** a été prévu pour 2019 dans le cadre d'une ATU.

### **Cas clinique 7 :**

Patient de 39 ans, originaire du Cameroun, examiné par le service d'Hépatogastro-Entérologie, en mai 2017.

Le bilan hépatique réalisé le 19/05/2017 montre :

- ➔ une cytolysse hépatique modérée
- ➔ une sérologie VHB en faveur d'une hépatite B chronique inactive :
  - Ag HBs positif
  - Ac anti-HBs négatifs
  - Ac anti-HBc positifs
  - ADN VHB indétectable

Dans ce contexte, une sérologie VHD est réalisée, retrouvant des Ac IgM anti-VHD et Ac totaux anti-VHD positifs. La recherche de l'ARN VHD montre une répllication virale positive (359 272 904 UI/mL).

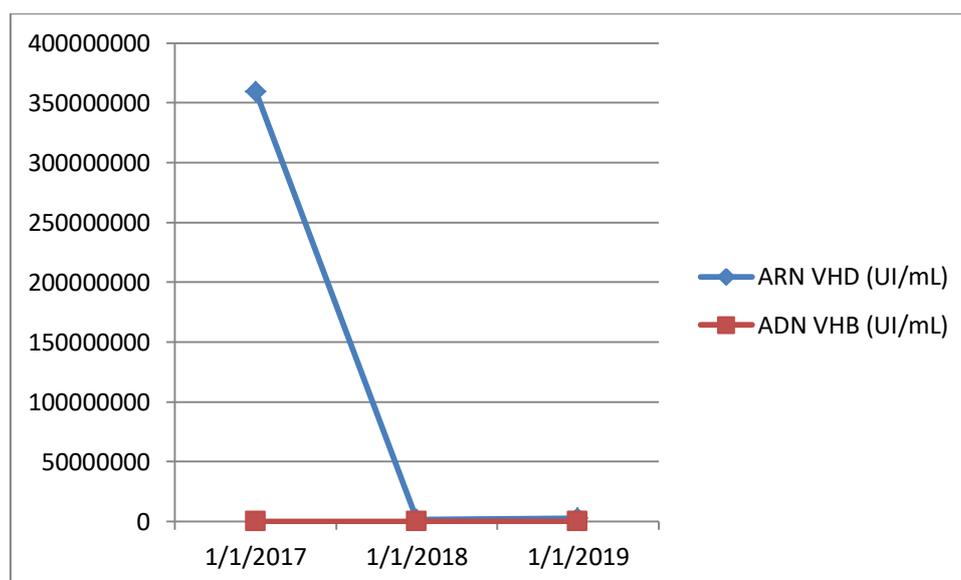
Le FibroScan est en faveur d'une fibrose sévère (médiane 12,3 KPa; QR 0,4).

L'échographie abdominale montre un foie dysmorphique non stéatosique, sans lésion nodulaire parenchymateuse et sans thrombose porte.

Un traitement par **Viread®** et **Pegasys®** est instauré immédiatement. Le traitement par Pegasys® est pris par cures de 1 an à plusieurs reprises.

On observe une diminution légère de la charge VHD mais qui reste toujours élevée. La charge VHB reste indétectable.

CV	19/05/2017	19/06/2018	13/09/2019
ARN VHD (UI/mL)	359272904	1604063	2932228
ADN VHB (UI/mL)	indétectable	indétectable	indétectable



### **Conclusion des cas cliniques :**

La quantification de la CV permet de mesurer l'efficacité du traitement institué dans le cadre d'une infection par le VHD. Pour les patients présentés, le traitement par Pegasys® s'avère inefficace. L'efficacité du Bulevirtide®, qui a commencé à être utilisé le 9 septembre 2019, dans le cadre des ATU, est à suivre.

On observe, comme décrit dans la littérature, que chez les patients présentant une triple infection, le VHD est le virus dominant, car il inhibe non seulement la réplication du VHB, mais également la réplication du VHC.

La technique EurobioPlex qRT-PCR VHD installée au laboratoire de Virologie permet donc la quantification de toutes les charges pour ces patients suivis au CHU de Bordeaux.

# PARTIE III : DISCUSSION

L'infection par le VHD augmente la sévérité de la maladie hépatique virale. Du point de vue épidémiologique, l'agent Delta a été trouvé partout dans le monde, et s'est avéré une cause majeure d'hépatite aiguë et chronique sévère. Son diagnostic est donc essentiel pour les patients infectés par le VHB. La charge ARN du VHD doit être évaluée et surveillée dans le plasma par des tests réalisés par RT-PCR en temps réel. La quantification de l'ARN VHD est devenue un problème diagnostique majeur, tant pour la prise en charge des patients que pour l'évaluation de nouvelles thérapies anti-HDV spécifiques. (56)

L'objectif principal de cette étude était de réaliser la validation biologique de méthode de la trousse EurobioPlex VHD au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux, en vue de son utilisation ultérieure en « routine ». Plusieurs manipulations ont été réalisées : en première étape - 23 échantillons ont été testés pour la comparaison de méthode entre les dosages du CNR associé Delta (Hôpital Avicenne, Bobigny) et nos résultats ; ensuite, des manipulations pour la partie de répétabilité pour le niveau bas et haut ont été réalisées et enfin l'utilisation du standard OMS a été décrite.

Le standard OMS, le premier contrôle international externe de la qualité pour la quantification de la charge VHD, a permis la conversion des résultats en UI/mL à partir de copies/mL. Dans le cadre de la validation de méthode de la trousse EurobioPlex qRT-PCR Hépatite Delta, tous les résultats des charges virales du VHD du laboratoire de Virologie de Bordeaux, exprimés en copies/mL, ont été multipliés par le coefficient de corrélation calculé, ce qui a permis la comparaison des résultats pour les deux dosages.

Une sous-estimation des résultats par notre laboratoire a été observée, pourtant avec une bonne corrélation, concordance et conformité des résultats, ce qui permet la validation de méthode. Comme hypothèse, cette sous-estimation peut être due à la congélation/décongélation des échantillons, d'où le risque d'altération de l'ARN du VHD si les conditions d'acheminement ne sont pas respectées. Une autre hypothèse est que nous utilisons une extraction et un automate PCR différents du CNR donc nos résultats ne sont pas forcément superposables. Ainsi, le système d'extraction (MagNa Pure Compact) que nous avons utilisé nous a amenés à modifier les volumes de prélèvement et d'éluat. Nous avons dû également nous adapter aux automates de PCR disponibles au Laboratoire de Virologie de Bordeaux.

En ce qui concerne l'impact clinique, les résultats faiblement positifs montrent une bonne fiabilité des dosages donc pas d'impact clinique a priori. Des études ont montré que de la plupart des techniques "maison " ou commerciales sous-estiment considérablement les charges VHD ou sont incapables de détecter l'ARN du VHD dans les échantillons cliniques. Ces écarts entre les analyses se sont révélés être principalement liés à la grande diversité génétique du VHD et aux amorces et sondes mal adaptées. (56) Ce n'est probablement pas le cas pour les échantillons testés au cours de notre étude, puisque la même trousse est utilisée par le CNR. Toutes les différentes étapes devraient idéalement être automatisées de manière à fournir une trousse efficace et facile à utiliser offrant une spécificité et une sensibilité élevées, ce qui améliorerait considérablement le suivi des patients par les nouvelles thérapies anti-VHD ciblées. La technique testée au laboratoire de virologie de Bordeaux n'est pas entièrement automatisée, mais fait appel à plusieurs automates dont la fiabilité a été éprouvée pour de nombreuses autres techniques diagnostiques. Toutefois, un "inconvenient" de la manipulation telle que nous l'avons pratiquée est la dilution en cascade pour chaque gamme à réaliser, pouvant induire plus de risques d'erreurs comparativement à des réactifs prêts à l'emploi.

Enfin, la fréquence des runs de PCR VHD au laboratoire de Virologie va être établie en fonction du nombre de demandes. Pour rappel, 170 demandes de quantification de l'ARN VHD ont été adressées à notre laboratoire, parmi lesquelles 108 justifiaient vraiment un envoi au CNR VHD entre le 1<sup>er</sup> Mars 2018 et le 1<sup>er</sup> Août 2019. De plus, les demandes de quantification de la CV ARN du VHD risquent d'augmenter en raison de suivi du traitement par Bulevirtide® dans le cadre de l'ATU.

# CONCLUSION

L'infection par le VHD est une maladie ayant un impact significatif sur la santé mondiale et encore largement sous-estimée. Dans le monde, environ 240 millions d'individus sont AgHBs positifs, parmi lesquels 2 à 8% sont co-infectés par le VHD, il en résulte 10-20 millions de personnes souffrant d'hépatite delta. (6) Par ailleurs, on a observé que chez les patients présentant une triple infection VIH-VHB-VHC, le VHD est le virus dominant, car il inhibe non seulement la réplication du VHB, mais également la réplication du VHC.

La recherche d'une coinfection delta grâce à la sérologie VHD doit obligatoirement être réalisée au moins une fois chez tous les sujets porteurs de l'Ag HBs. Lorsque la sérologie VHD est positive, il conviendra de rechercher l'ARN Delta avec, surtout, la quantification de la charge virale ARN par qRT-PCR en temps réel, qui est l'examen maître pour le diagnostic et la prise en charge des patients. La présence d'ARN Delta permet aux cliniciens non seulement de confirmer le caractère réplicatif de l'infection, mais aussi de mesurer l'efficacité du traitement institué et de suivre les patients par la charge virale, surtout le traitement par Bulevirtide® dans le cadre de l'ATU.

Notre étude a permis de réaliser la validation biologique de méthode de la trousse EurobioPlex qRT-PCR VHD au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux, en vue de son utilisation ultérieure en « routine ». Elle a porté sur 23 échantillons qui ont été testés pour la comparaison de méthode entre les dosages du CNR associé Delta (Hôpital Avicenne, Bobigny) et nos résultats. L'expression des résultats en UI/mL a été possible grâce au recours au standard OMS.

Enfin, malgré une curieuse sous-estimation des résultats par notre laboratoire, qui peut être liée aux différences techniques (automates), une bonne corrélation, concordance et conformité des résultats ont été observées. Ceci nous a permis de nous soumettre récemment à l'Evaluation Externe de la Qualité proposée par le CNR, dont nous attendons actuellement les résultats. Ainsi, dès que possible, la trousse EurobioPlex qRT-PCR VHD sera utilisée au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux pour le diagnostic et le suivi des patients infectés par le VHD.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Composition de la trousse EurobioPlex VHD qRT-PCR

RC : Contrôle interne ARN (500 copies/ $\mu$ L)
Amorces et sondes pour VHD et RC
VHD-QS : standard pour quantification (matrice synthétique ARN VHD + RC)
Eau PCR
Réaction Mix :Taq polymérase, 6mM Mg-chloride et dNTPs
Enzyme Reverse transcriptase

## Annexe 2 : Analyse de performances du coffret EurobioPlex qRT-PCR VHD

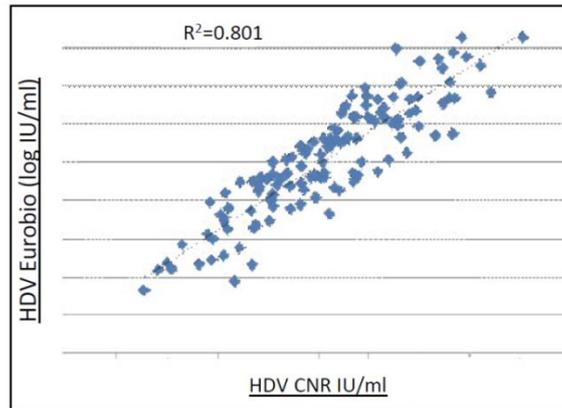
<p>EUROBIO - 7, avenue de Scandinavie ZA de Courtaboeuf - 91953 Les Ulis Cedex B - France P: +33 1 69 07 94 77 / F: +33 1 69 07 95 34 adv@eurobio.fr / www.eurobio.fr</p>	<p>Represented by: Bioactiva diagnostica GmbH, Luisenstrasse 137 61348 Bad Homburg, GERMANY P: +49-6172-17102-0, F: +49-6172-17102-29, <a href="mailto:t.koehler@bioactiva.de">t.koehler@bioactiva.de</a> / <a href="http://www.bioactiva.de">www.bioactiva.de</a></p>
---	--

### 1. Sensibilité analytique et linéarité de quantification :

La sensibilité analytique est définie comme la plus petite quantité de cible qui peut être détectée dans un échantillon. La limite de détection pour ce kit EurobioPlex qRT-PCR VHD a été établie par le fabricant à  $1^{E+02}$  UI/mL, l'unité internationale correspondant à celle de l'étalon international du Paul Ehrlich Institut. Par ailleurs, le domaine de linéarité de quantification validé est de  $1^{E+02}$  UI/mL à  $1^{E+8,3}$  UI/mL sur un échantillon clinique.

### 2. Sensibilité aux différents génotypes du VHD :

La performance de l'EurobioPlex VHD a été évaluée par le fabricant sur 130 échantillons représentant tous les génotypes viraux. Un coefficient de corrélation  $R^2=0,8$  a été calculé indiquant l'excellente corrélation des résultats entre les deux techniques quel que soit le génotype viral (**Figure 41**).



**Figure 41. Quantification de la charge VHD – Corrélation entre le coffret EurobioPlex VHD et le CNR Delta pour tous les génotypes viraux - 130 prélèvements analysés**

(<http://www.biocore-diagnostics.de/PDF/News/EurobioPlex-Hepatitis-D-REAL-TIME%20RT%E2%80%90PCR-kit.pdf>)

### 3. Spécificité analytique sur échantillons non-VHD:

Des échantillons de plasma négatifs pour la détection des Ac anti-VHD mais positifs pour d'autres virus hépatotropes (VHB, VIH, VHC, VHA, VHE) ont été testés par le fabricant et aucune fausse positivité n'a été retrouvée, ce qui montre une excellente spécificité analytique.

Au total, 610 prélèvements ont été analysés, en déterminant une spécificité clinique et diagnostique de 93,4 % et une sensibilité de 97,7 % (**Figure 42**).

<b>Specificity 93.4%</b> <b>Sensitivity 97.7%</b>		<b>EUROBIO</b>	
		Pos	Neg
<b>CNR</b>	Pos	389	9*
	Neg	14*	198

\* échantillons avec une charge virale très faible (< 3log UI/mL soit <1000 UI/mL)

**Figure 42. Spécificité et sensibilité clinique et diagnostique du coffret EurobioPlex VHD**

(<http://www.biocore-diagnostics.de/PDF/News/EurobioPlex-Hepatitis-D-REAL-TIME%20RT%E2%80%90PCR-kit.pdf>)

# BIBLIOGRAPHIE

1. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Trepo C, Bonino F, Verme G. Immunofluorescence detection of new antigen- antibody system (S/anti-5) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*. dec 1977; 18(21): 997-1003.
2. Rizzetto M. The Delta Agent. *Hepatology*. 21 sept 2007;3(5): 729-37.
3. Farci P, Niro GA. Current and Future Management of Chronic Hepatitis D. *Gastroenterology & Hepatology*. juin 2018; 14 (6): 342-351.
4. Abeywickrama-Samarakoon N, Cortay J-C, Sureau C, Alfaiate D, Levrero M, Dény P. Réplication du génome du virus de l'hépatite delta : un rôle pour la petite protéine delta S-HDAg. *médecine/sciences*. oct 2018;34(10): 833-41.
5. Alfaiate D, Miaglia C, Zoulim F. Hépatite delta : aspects cliniques et perspectives thérapeutiques. *La Presse Médicale*. mars 2017;46(3): 271-81.
6. Wranke A, Pinheiro Borzacov LM, Parana R, Lobato C, Hamid S, Ceausu E, et al. Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN). *Liver International*. mai 2018;38(5): 842-50.
7. Sahin A. Anti-HDV Seroprevalance Among Patients with Past HBV Infection. *Northern Clinics of Istanbul*. mai 2018; 5 (2): 132-138.
8. Kuo MY, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol*. déc 1988;62(12): 4439-44.
9. Sureau C, Guerra B, Lanford RE. Role of the Large Hepatitis B Virus Envelope Protein in Infectivity of the Hepatitis Delta Virion. *J Virol*. 1993;67 (1): 366-372.
10. Rizzetto M, Gerin JL. delta agent: Association of a antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of B-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77 (10): 6124-6128.
11. Sureau C, Moriarty AM, Lanford' RE. Production of Infectious Hepatitis Delta Virus In Vitro and Neutralization with Antibodies Directed against Hepatitis B Virus Pre-S Antigens. *J Virol*. 1992;66 (2) : 1241-1245.
12. Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, Gerlich WH. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol*. juin 1986;58(3): 945-50.

13. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*. 13 nov 2012;1: 1-28.
14. Gripon P, Canine I, Urban S. Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by Acylated Peptides Derived from the Large Viral Surface Protein. *J Virol*. 1 févr 2005;79(3): 1613-22.
15. Chang J, Nie X, Chang HE, Han Z, Taylor J. Transcription of Hepatitis Delta Virus RNA by RNA Polymerase II. *J Virol*. 1 févr 2008;82(3): 1118-27.
16. Polson AG, Bass BL, Casey JL. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature*. 4 avr 1996;380(6573): 454-6.
17. Chen P-J, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, WERNERt B, GERINt J, et al. Structure and replication of the genome of the hepatitis 6 virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;5: 8774-8778.
18. Bordier BB, Marion PL, Ohashi K, Kay MA, Greenberg HB, Casey JL, et al. A Prenylation Inhibitor Prevents Production of Infectious Hepatitis Delta Virus Particles. *J Virol*. 15 oct 2002;76(20): 10465-72.
19. Fattovich G. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut*. 1 mars 2000;46(3): 420-6.
20. Braga WSM, Castilho M da C, Borges FG, Leão JRDT, Martinho AC de S, Rodrigues IS, et al. Hepatitis D virus infection in the Western Brazilian Amazon - far from a vanishing disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. déc 2012;45(6): 691-5.
21. Genné D, Rossi I. Hepatitis delta in Switzerland: a silent epidemic. *Swiss Medical Weekly*. 18 mars 2011 ; 141 : 13176-13179.
22. Farci P, Niro G. Clinical Features of Hepatitis D. *Seminars in Liver Disease*. août 2012;32(03): 228-36.
23. Caredda F, Rossi E. Hepatitis B Virus-Associated Coinfection and Superinfection with d Agent: Indistinguishable Disease with Different Outcome. *The Journal Of Infectious diseases*. Mai 1985; 151 (5): 925-928.
24. Grabowski J, Wedemeyer H. Hepatitis Delta: Immunopathogenesis and Clinical Challenges. *Digestive Diseases*. 2010;28(1): 133-8.
25. Yurdaydin C, Idilman R, Bozkaya H, Bozdayi AM. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis: Chronic delta hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis*. nov 2010;17(11): 749-56.

26. Castellares C, Barreiro P, Martín-Carbonero L, Labarga P, Vispo ME, Casado R, et al. Liver cirrhosis in HIV-infected patients: prevalence, aetiology and clinical outcome. *Journal of Viral Hepatitis*. 27 août 2008; 15(3): 165-172.
27. Alves C, Branco C, Cunha C. Hepatitis Delta Virus: A Peculiar Virus. *Advances in Virology*. 2013;2013: 1-11.
28. Gordien E. /The Hepatitis Delta Virus Infection: Recent Data in France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (BEH)*. juin 2015 : 347-352
29. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *The Lancet*. oct 2015;386(10003): 1546-55.
30. Chen H-Y, Shen D-T, Ji D-Z, Han P-C, Zhang W-M, Ma J-F, et al. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut*. 18 sept 2018: 1-9.
31. Wedemeyer H, Negro F. Devil hepatitis D: an orphan disease or largely underdiagnosed?. *GuT*. 2018; 68 (3): 381-382.
32. Komas NP, Ghosh S, Abdou-Chekarou M, Pradat P, Al Hawajri N, Manirakiza A, et al. Hepatitis B and hepatitis D virus infections in the Central African Republic, twenty-five years after a fulminant hepatitis outbreak, indicate continuing spread in asymptomatic young adults. Geretti A, éditeur. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 26 avr 2018;12(4): 63-77.
33. Barros LMF, Gomes-Gouvêa MS, Pinho JRR, Alvarado-Mora MV, Dos Santos A, Mendes-Corrêa MCJ, et al. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: Inheritance from African slaves? *Virus Research*. sept 2011;160(1-2): 333-9.
34. Le Gal F, Brichtler S, Drugan T, Alloui C, Roulot D, Pawlotsky J-M, et al. Genetic diversity and worldwide distribution of the *deltavirus* genus: A study of 2,152 clinical strains: Le Gal et al. *Hepatology*. déc 2017;66(6): 1826-41.
35. Jean-Charles L. Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic et à la prise en charge des hépatites B, C et D. *HAS*.2017: 99-100.
36. Lunel-Fabiani F, Mansour W, Amar AO, Aye M, Le Gal F, Malick F-ZF, et al. Impact of hepatitis B and delta virus co-infection on liver disease in Mauritania: A cross sectional study. *Journal of Infection*. nov 2013;67(5): 448-57.

37. Le Gal F, Dziri S, Gerber A, Alloui C, Ben Abdesselam Z, Roulot D, et al. Performance Characteristics of a New Consensus Commercial Kit for Hepatitis D Virus RNA Viral Load Quantification. Tang Y-W, éditeur. *Journal of Clinical Microbiology*. févr 2017;55(2): 431-41.
38. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *The Lancet*. juill 2011;378(9785): 73-85.
39. Vergniol J, Foucher J, Terrebonne E, Bernard P, le Bail B, Merrouche W, et al. Noninvasive Tests for Fibrosis and Liver Stiffness Predict 5-Year Outcomes of Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. juin 2011;140(7): 1970-1979.
40. Item 228 : Cirrhose et complications. Université Médicale Virtuelle Francophone. 2009: 1-30.
41. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang K-M, Hwang JP, Jonas MM, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology*. avr 2018;67(4): 1560-99.
42. Lemoine E. Traitement des hépatites B, C, D. Développement et Santé, traitement et vaccins, Université d'Angers ; 2010: 1-2.
43. Farci P. Treatment of chronic hepatitis D: New advances, old challenges. *Hepatology*. sept 2006;44(3): 536-7.
44. Farci P. Delta hepatitis: an update. *Journal of Hepatology*. janv 2003;39: 212-9.
45. Farci P. Treatment of chronic hepatitis D: New advances, old challenges. *Hepatology*. sept 2006;44(3): 538-9.
46. Wedemeyer H, Erhardt A, Gürel S, Bozkaya H, Dienes HP. Peginterferon plus Adefovir versus Either Drug Alone for Hepatitis Delta. *N Engl J Med*. 2011;10: 322-331.
47. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. juill 2012;57(1): 167-85.
48. National Clinical Guideline Centre (UK). Hepatitis B (Chronic): Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B in Children, Young People and Adults [Internet]. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2013: 44-60.
49. Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV Into Hepatocytes. *Gastroenterology*. juill 2014;147(1): 48-64.
50. Farci P, Niro GA. Current and Future Management of Chronic Hepatitis D. *Gastroenterology & Hepatology*. juin 2018; 14 (6) : 342-351.

51. Krause A, Haberkorn U, Mier W. Strategies for the treatment of HBV/HDV. *European Journal of Pharmacology*. août 2018;833: 379-91.
52. Lütgehetmann M, Mancke LV, Volz T, Helbig M, Allweiss L, Bornscheuer T, et al. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology*. mars 2012;55(3): 685-94.
53. Bordier BB, Ohkanda J, Liu P, Lee S-Y, Salazar FH, Marion PL, et al. In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *Journal of Clinical Investigation*. 1 août 2003;112(3): 407-14.
54. Bazinet M, Pantea V, Cebotarescu V, Cojuhari L, Jimbei P, Vaillant A. LO2 : Significant reduction of HBsAg and HDV RNA by the nucleic acid polymer REP 2139 in caucasian patients with chronic HBV/HDV co-infection. *Journal of Hepatology*. avr 2015;62: 257-8.
55. Roggendorf M. Perspectives for a Vaccine against Hepatitis Delta Virus. *Seminars in Liver Disease*. août 2012;32(03): 256-61.
56. Frédéric L, Ségolène B, Roland S, Sylvie C, Emmanuel G . First International External Quality Assesement for Hepatitis Delta Virus RNA Quantification in Plasma. *Hepatology* 2016; 64 : 1483-1494.

## SERMENT D'HIPPOCRATE

---

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

## **Validation de méthode de la trousse EurobioPlex qRT-PCR Hépatite Delta au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux**

---

L'infection par le virus de l'hépatite delta (VHD), satellite du virus de l'hépatite B (VHB) est encore largement sous-estimée. Dans le monde, 10 à 20 millions de personnes seraient infectées. Lorsqu'une co-infection VHB-VHD est détectée par la sérologie, il est nécessaire de quantifier l'ARN Delta pour confirmer le caractère réplicatif de l'infection et assurer une bonne prise en charge des patients. Ceci est d'autant plus important qu'un traitement par Bulevirtide® peut maintenant être proposé.

Selon nos objectifs, notre étude a permis la validation biologique de la méthode de RT-PCR quantitative EurobioPlex qRT-PCR VHD au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux, en comparant sur 23 échantillons nos résultats à ceux du Centre National de Référence associé Delta (Hôpital Avicenne, Bobigny). L'expression des résultats en UI/mL a été possible grâce au standard OMS.

Malgré une sous-estimation des résultats par notre laboratoire, peut-être liée aux différences techniques (automates d'extraction et de PCR), une bonne corrélation, concordance et conformité des résultats ont été observées. Ceci nous a permis de nous soumettre récemment à l'Evaluation Externe de la Qualité proposée par le CNR, préalable incontournable à l'utilisation en routine de la trousse EurobioPlex qRT-PCR VHD au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux pour le diagnostic et le suivi des patients infectés par le VHD.

**Mots-clés** : virus de l'hépatite delta, EurobioPlex qRT-PCR VHD, standard OMS

---

### **Method validation of the EurobioPlex kit at the virology laboratory of the Bordeaux University Hospital**

Hepatitis Delta virus (HDV) is a satellite of Hepatitis B virus (HBV). Its prevalence is underestimated, but 10 to 20 millions persons could be infected all around the world. When HBV-HDV coinfection is serologically diagnosed, HDV RNA must be quantified to confirm its replicative status and insure a proper follow up of the patients. This is particularly important because anti anti-viral treatment (Bulevirtide) is now available.

According to our aims, our study allowed the biological validation of the commercially available quantitative RT-PCR assay EurobioPlex qRT-PCR HDV in Bordeaux University Hospital Virology department. We compared our results on 23 clinical samples with those obtained by the National Reference Center (CNR) for HDV infection. Results were expressed in IU/mL thanks to a WHO international standard.

Our quantitative results appeared underestimated in comparison with those obtained by the CNR on the same samples ; this could result from the use of different extraction and amplification systems. However, correlation, concordance and conformity data were satisfactory. This allowed us to submit this method in our laboratory setting to the national external quality evaluation. Hopefully, the test will soon be used in the laboratory for the diagnosis and monitoring of HDV-positive patients.

**Keywords** : hepatitis delta virus, EurobioPlex qRT-PCR HDV, WHO international standard