

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie

Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Année : 2015

Numéro : 1042

**ÉTUDE DE LA SÉROPRÉVALENCE DANS UN CONTEXTE
ÉPIDÉMIQUE DU VIRUS DE L'HÉPATITE E DANS LA
RÉGION DE KÉDOUGOU**

Mémoire de Master II

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Présenté et publiquement soutenu

Le 29 mars 2016

Par

Bacary Djilocalisse SADIO

MEMBRES DU JURY

Président : Pr Cheikh Saad Bouh BOYE (UCAD)

Membres : Pr Gora MBAYE (UCAD)

Dr Babacar MBENGUE (UCAD)

Dr Abdou Kader NDIAYE (IPD)

Directeur de mémoire : Dr Amadou Alpha SALL (IPD)

Co-Directeur de mémoire : Dr Abdourahmane SOW (IPD)

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma très chère et adorable Maman, madame feu Maïmouna Mané pour qui je ne saurais trouver les mots justes pour exprimer l'amour, la tendresse et la reconnaissance que j'éprouve pour elle. Elle a toujours été présente à mes cotés, n'a cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Sans elle, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Saches que je te dois tout et que je te suis redevable d'une dette de gratitude perpétuelle, dont je ne pourrai jamais me libérer. Qu'Allah vous accorde le Paradis.

Quant à mon papa, vous nous avez enseigné les valeurs cardinales telles que l'amour de la justice et de l'honnêteté. Que le bon Dieu vous accorde santé et longue vie. Ce modeste travail est le fruit de vos innombrables sacrifices. Acceptez-le comme témoignage de ma reconnaissance.

Ce travail est aussi dédié à ma très chère femme Maïmouna DIÉMÉ pour avoir eu l'amabilité de bien s'occuper et protéger mes fils El Hadji Malick Sy SADIO et Abdou Zaki SADIO et aussi mon neveu Maktar Seliki MANÉ durant mon absence pendant une longue période pour cause d'étude. Je la remercie pour sa patience, sa compréhension et aussi son soutien indéfectible en ces périodes où j'en ai vraiment besoin.

Enfin ce travail est dédié à mes parents et mes sœurs pour avoir toujours été présents et pour m'avoir aidé à réaliser mes projets. Quant à toi, Oumar SADIO, mon petit frère, merci de ton soutien et de ton hébergement au moment où j'en avais le plus besoin.

Remerciements

Je voudrais rappeler que ce mémoire n'est pas seulement le fruit de mon travail ; il est le résultat d'un travail d'équipe, de concertation et de critique avec des personnes qui y ont cru et m'ont soutenu.

Je tiens d'abord à exprimer toute ma gratitude au Dr Amadou Alpha Sall, Chef du Pôle de virologie et Directeur Scientifique de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD), qui voilà 2 ans m'a donné un projet de recherche et m'a encadré durant cette période et n'a cessé depuis de m'apporter conseils et soutiens. Merci, Monsieur, de m'avoir fait confiance et de m'avoir fait bénéficier de formidables opportunités professionnelles.

J'adresse mes sincères remerciements à mon ami et frère, le Dr Cheikh Tidiane Diagne pour m'avoir aidé à achever ce travail. Ses connaissances, sa maîtrise des logiciels et de l'outil informatique m'ont beaucoup aidé quant à la mise en forme et à la réalisation des figures. Mon très cher ami merci pour tout ton soutien.

Nos vifs remerciements vont aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de lire et critiquer ce travail.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Dr Abdourahmane SOW, pour avoir dirigé mon travail. Avec toute mon amitié.

Je tiens également à remercier les Drs Gamou FALL, Oumar FAYE, Fany BALIQUE, Cheikh LOUCOUBAR, Mor Absa LOUM pour avoir accepté de lire mon document et pour avoir apporté leurs remarques et suggestions.

Je tiens aussi à remercier particulièrement Mme Rouguiétou SYLLA, pour son assistance sur mes travaux de laboratoire. Mes remerciements vont aussi à tout le personnel de l'Unité des Arbovirus et Virus des Fièvres Hémorragique de l'IPD : Magaye, Moussa DIA, Arame, Seynabou, Oumar NDIAYE, Fatou DIOP, Moussa Moise, Martin, Ndèye BOB, Fatou DIA, Fatim, Henriette, Aissatou, Carlos, Modou, Guèye.

Je tiens aussi à remercier le Dr Mawlouth DIALLO, responsable de l'Unité d'Entomologie Médicale à l'IPD, les Drs Yamar BA, Ibrahima DIA, Diawo DIALLO pour leurs conseils et leur soutien au moment où j'en avais vraiment besoin. Mes remerciements vont aussi à tout le personnel de l'Unité d'Entomologie Médicale : El Hadji Malick, Faty, GAYE, Cheikh TALLA, El Hadji NDIAYE, Thiaw, Manga et mon très cher papa Abdou Karim BODIAN.

Sommaire

Liste des Figures.....	i
Liste des Tableaux.....	i
Liste des Abréviations.....	ii
INTRODUCTION.....	1
I. Historique du virus de l'hépatite E.....	3
II.1 Génome de l'hépatite E.....	3
II.3 Reservoir du virus de l'hépatite E.....	4
II.4 Cycle de réplication du virus.....	5
IV. La maladie à virus de l'hépatite E.....	8
IV.1 Mode de contamination du virus de l'hépatite E.....	8
IV.2. Formes clinique du virus de l'hépatite E.....	9
V. Diagnostic du virus de l'hépatite E.....	10
V.1- Diagnostic direct du virus de l'hépatite E.....	10
V.2 Diagnostic indirect du virus de l'hépatite E.....	10
VI. Prévention et traitement.....	11
VI.2 Traitement.....	11
DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL EXPÉRIMENTAL.....	13
I. Cadre d'étude.....	14
II. Contexte et justificatif de l'étude.....	15
III. Objectifs de l'étude.....	15
IV. Matériel et méthode.....	15
IV.1 Démarche méthodologique.....	15
IV.2 Tests de laboratoire.....	17
V. RÉSULTATS.....	26
V.1 Description de la population d'étude.....	26
V.2. Séroprévalence de l'hépatite E.....	27
V.2.1. Séroprévalence en fonction de l'âge, du sexe et du risque d'exposition au VHE.....	27
V.2.2. Séroprévalence en fonction de l'origine géographique.....	30
V.2.3- Analyse de la symptomatologie clinique.....	30
DISCUSSION.....	33
CONCLUSION.....	36
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37

Liste des Figures

Figure 1 : représentation schématique du génome du VHE.....	4
Figure 2 : Cycle de répllication du virus de l'hépatite E.....	6
Figure 3 : Distribution mondiale du virus de l'hépatite E.....	8
Figure 4 : Évolution des marqueurs virologiques du VHE.	11
Figure 5 : Carte représentant les districts de Saraya, de Kédougou et de Salémata dans la région de Kédougou.	14
Figure 6 : Principe du test HEV IgM ELISA	19
Figure 7 : Plan de plaque HEV IgM ELISA.	21
Figure 8 : Schéma du principe du test HEV IgG ELISA.	22
Figure 9 : Description de l'âge en fonction du sexe.....	26
Figure 10 : Distribution des patients par origine géographique	27
Figure 11 : Distribution de l'hépatite E (AC-IgM) et le risque d'exposition en fonction de l'âge.....	29
Figure 12 : Distribution de l'hépatite E (AC-IgM) et le risque d'exposition en fonction du sexe.....	29
Figure 13 : Représentation schématique des différents types d'hémorragies	31

Liste des Tableaux

Tableau I : Séroprévalence du virus de l'hépatite E, selon l'âge, le sexe et l'exposition au cours de l'investigation dans la région de Kédougou.	28
Tableau II : Séroprévalence sur la population selon l'origine géographique.....	30
Tableau III : Analyses univariée et multivariée des résultats selon l'âge, le sexe et les signes cliniques.	32

Liste des Abréviations

AC-IgG	: Anticorps Immunoglobuline G
AC-IgM	: Anticorps immunoglobuline M
ARN	: Acide Ribonucléique
°C	: Degrés Celsius
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
F	: Femme
H	: Homme
HEV	: Hepatitis E Virus
IC 95%	: Intervalle de Confiance à 95 Pour Cent
IgG	: Immunoglobuline G
IgM	: Immunoglobuline M
IPD	: Institut Pasteur de Dakar
KDa	: Kilodalton
VHE	: Virus de l'Hépatite E
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Pvalue	: la valeur P
OR	: Odd Ratio
ORF	: Open Reading Frame
RT-PCR	: Reverse Transcription –Polymerase Chain Reaction
TMB	: Tétraméthylbenzidine

INTRODUCTION

L'hépatite E est une maladie du foie provoquée par le virus de l'hépatite E (VHE). Ce virus appartient à la famille *Hepeviridae* et au genre *hepevirus*. L'infection aiguë à VHE peut entraîner un ictère fébrile, de l'asthénie, une anorexie et des nausées-vomissements mais régresse spontanément entre 4 à 6 semaines [1]. Dans de rares cas, une hépatite E aiguë peut évoluer en hépatite fulminante (insuffisance hépatique aiguë) et entraîner des décès. Les taux de mortalité dus à l'hépatite E dans l'ensemble de la population varie de 0,5 à 4% [1]. Les femmes enceintes sont plus susceptibles aux formes compliquées de la maladie entraînant un taux de mortalité de 20% chez ces dernières au dernier trimestre, ce qui fait de l'infection à VHE, l'hépatite la plus grave de toutes les hépatites virales pendant la grossesse [2].

Il n'existe pas de traitement étiologique mais un vaccin contre l'hépatite E a été homologué en Chine en 2011 [3]. Bien qu'il ne soit pas disponible partout dans le monde, il est susceptible de le devenir dans plusieurs pays.

Le virus de l'hépatite E circule à l'état endémique dans plusieurs régions du globe (figure 9) caractérisées par des conditions de vie précaires et l'absence d'hygiène. Très souvent les épidémies de l'hépatite E se produisent dans les régions chaudes à fortes pluies et après les moussons en raison des perturbations de l'approvisionnement en eau qu'elles entraînent.

Néanmoins, des cas sporadiques importés par les voyageurs étaient décrits dans les pays riches. Au Sénégal, dans la région de Kédougou, l'épidémie du VHE a été constatée dans les zones minières en 2014. Cependant des tests rétrospectifs en sérologie et en PCR pour la détermination du génome viral, ont permis aussi de savoir que d'autres épidémies sont passées inaperçues notamment en 2012 et en 2013. C'est dans ce contexte épidémiologique que nous avons mené cette étude dont l'objectif est d'étudier la séroprévalence du VHE dans la région de Kédougou, mais aussi d'évaluer l'ampleur réelle de cette épidémie par l'élévation des taux' IgM et d'IgG dirigés contre le virus.

PREMIÈRE PARTIE :
GÉNÉRALITÉS SUR LE VIRUS DE
L'HÉPATITE E

I. Historique du virus de l'hépatite E

Observé pour la première fois en microscopie électronique en 1983 dans les selles des patients atteints d'hépatite non-A et non B, le virus de l'hépatite E a été identifié de façon formelle par le clonage de son génome en 1990 [4, 5].

Ce type de virus a été suspecté depuis longtemps dans la transmission oro-fécale et responsable d'hépatite aiguë épidémique non-A et non-B. Une sévérité particulière du VHE au cours de la grossesse a été observée en 1955 à New Delhi, lors d'une épidémie d'origine hydrique touchant 29 300 personnes, soit un taux d'incidence de 2,3% avec un taux de mortalité égale à 10% chez les femmes enceintes [4].

Par ailleurs des études rétrospectives ont permis d'authentifier le rôle du VHE dans chaque épidémie. La gravité du VHE pendant la grossesse a été confirmée lors de chaque épidémie dans le monde, aussi bien en Afrique (Maghreb et Afrique de l'Est), en Asie (Asie mineure, sous-continent indien, Chine, Sud-Est Asiatique), qu'en Amérique Centrale (Mexique). Cette gravité du VHE observée au cours des différentes épidémies dans le monde, contribue à considérer de l'hépatite E comme un grave problème de santé publique.

II. Description du virus de l'hépatite E

II.1 Génome de l'hépatite E

Le virus de l'hépatite E (VHE) est un virus non enveloppé, à ARN monocaténaire à polarité positive (7,5 kb). Son génome est dit « de polarité positive » qui signifie que le génome viral est directement traduit par la machinerie cellulaire et sert directement d'ARN messager.

Ce génome comprend trois cadres de lecture ou ORF (Open Reading Frame) codant pour des protéines non structurales (ORF1 et ORF3) et des protéines structurales (ORF2).

L'ORF1 code pour une polyprotéine de 186 kDa, ultérieurement clivée en protéines non structurales dont une méthyltransférase et l'ARN polymérase ARN dépendante. L'ORF2 code pour la protéine de capsid glycosylée (p-ORF2) de 660 acides aminés. La phosphoprotéine d'un poids moléculaire de 13 kDa, codée par l'ORF3 est très variable selon les virus. Cette protéine dont le rôle reste à définir, serait impliquée dans les fonctions de régulation de la réplication virale ou dans l'assemblage de la nucléocapside [6].

L'identification d'épitopes fortement immunogènes codés par ORF2 et ORF3 a permis de mettre au point des tests sérologiques et de développer des antigènes vaccinaux (Figure 1).

Les particules virales ont un diamètre de 27 à 34 nanomètres et long de 7 300 bases. Ce virus possède une capside qui joue un rôle protecteur pour l'ARN et permet la liaison du virus avec un récepteur spécifique de la cellule hôte.

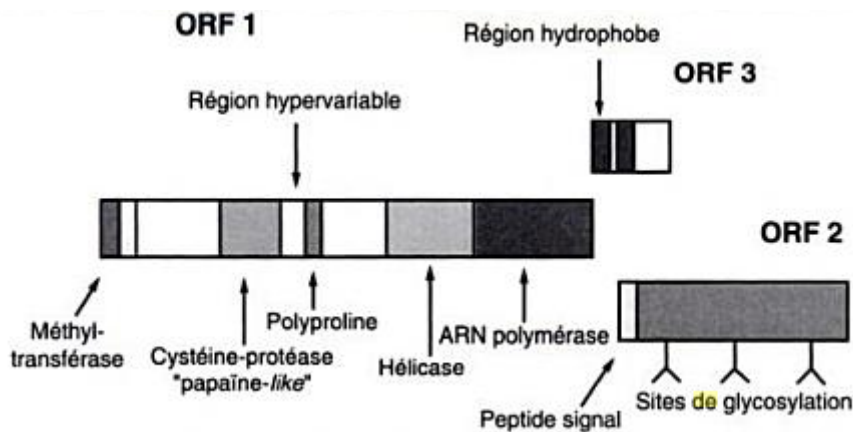


Figure 1 : Représentation schématique du génome du VHE [7]

II.2 Différents génotypes du virus

Les études phylogénétiques indiquent qu'il existe au moins quatre génotypes distincts du VHE (1-4), selon l'origine géographique [8, 9]. Les génotypes 1 et 2 sont considérés comme plus pathogènes, limités à l'humain, et responsables de la grande majorité des cas et des épidémies dans les régions endémiques, alors que les génotypes 3 et 4 infectent principalement plusieurs animaux mammifères, avec la transmission occasionnelle chez l'homme [10].

II.3 Reservoir du virus de l'hépatite E

L'homme est considéré comme le principal réservoir du virus. Les animaux domestiques ont été désignés comme pouvant servir de réservoir du VHE. En 2003, le cas rapporté d'un homme de 47 ans atteint de la maladie, et dont le chat était porteur d'anticorps témoignant d'une infection précédente [11]. Cependant la transmission à l'homme par cette voie ainsi que son importance pour la santé publique sont encore mal définies.

II.4 Cycle de réplication du virus

Le VHE pénètre dans l'organisme par voie digestive et gagne le foie où il se multiplie. Bien que le cycle de réplication ne soit pas encore totalement élucidé [12], les hépatocytes semblent être le seul site de réplication du virus qui se fixe sur celles-ci via des récepteurs cellulaires, il s'en suit alors fusion entre l'enveloppe virale et la paroi cellulaire. La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme (Pénétration et décapsulation du génome viral). L'ARN est immédiatement traduit par les ribosomes cellulaires en protéines structurales et non structurales. Ces protéines vont permettre la réplication du génome viral dans le cytoplasme, l'assemblage et la libération des virions. Ainsi Le VHE se réplique exclusivement dans les cytoplasmes des hépatocytes (figure 2). Au cours d'hépatite fulminante, le génome du virus, et de l'antigène viral intrahépatocytaire ont pu être mis en évidence dans plus de 50% des hépatocytes.

Histoire naturelle de la maladie

La virémie est transitoire, précédant de quelques jours le début de la phase clinique jusqu'à 2 à 3 semaines après le début de la symptomatologie. Dans quelques cas, la virémie a pu être détectée pendant 4 à 5 semaines. Quant à l'excrétion du virus dans les selles, elle précède de 4 à 8 jours la phase ictérique et persiste pendant les 3 à 4 semaines suivantes avec une durée maximum de 50 jours. C'est durant cette période, que le patient sera infectieux. Le titre viral dans les selles a été évalué par amplification génique après inoculation expérimentale intraveineuse chez des chimpanzés [13].

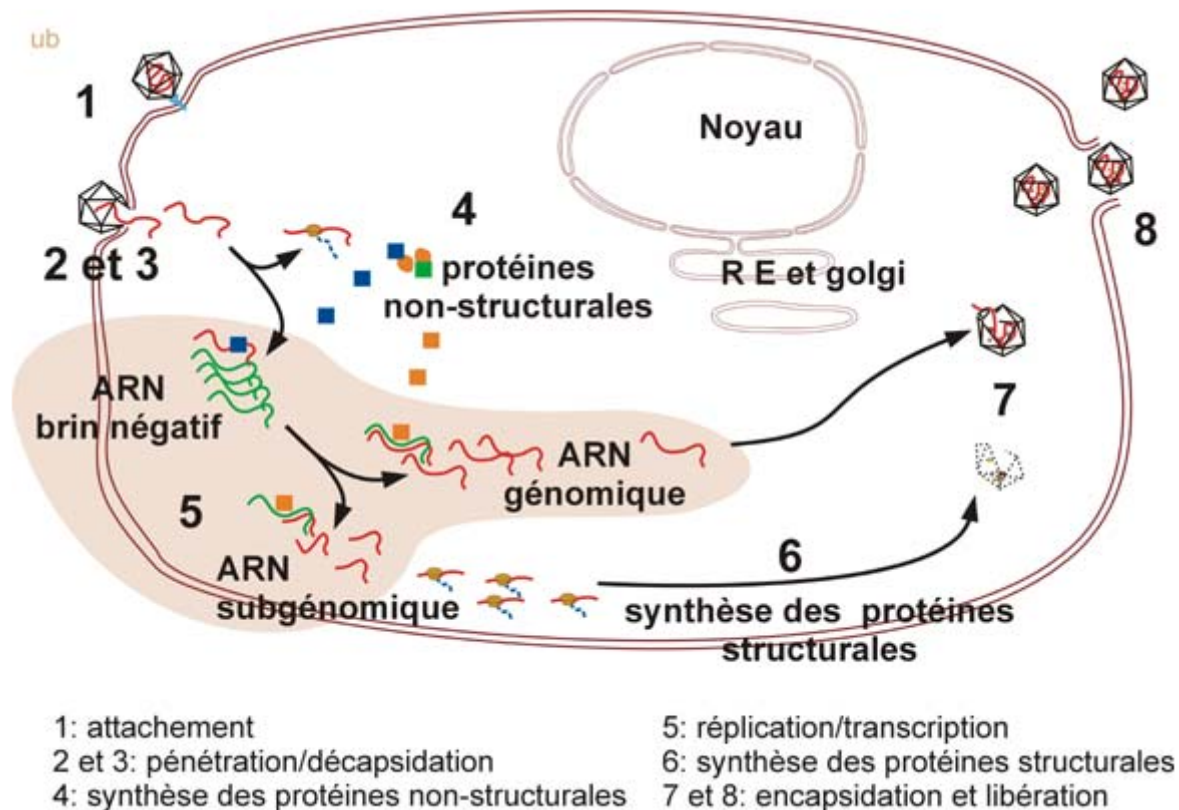


Figure 2 : Cycle de répllication du virus de l'hépatite E [14].

II.5. Résistance aux facteurs extérieurs

II.5.1 Les résistances physiques et chimiques

Le virus de l'hépatite E est sensible aux rayons ultraviolets et infrarouges. La résistance du VHE aux agents chimique et physiques est moindre par rapport à celle du VHE que pour le VHA. Cependant il est neutralisé par les produits tels que le chlore, hypochlorite de sodium, le glutaraldéhyde, l'ozone, iode et les sels d'argent.

II.5.2 Résistance dans l'environnement

Le VHE est relativement résistant au milieu extérieur comme la plupart des virus entériques non enveloppés. Les particules virales peuvent résister à l'acidité de l'estomac, aux sucs biliaires. La recherche du VHE dans les aliments ou dans l'environnement se fait par amplification génique. Cependant l'amplification génique ne va montrer que la présence d'ARN de VHE, sans pour autant préjuger de l'état du virus dans les milieux. Ainsi, un virus inactivé par les agressions extérieures (UV, oxydation, chaleur...) sera amplifiée par RT-PCR et l'échantillon sera considéré comme positif pour le VHE, alors qu'il ne présentait aucun pouvoir pathogène.

La seule méthode pouvant confirmer la pathogénicité virale demeure l'inoculation à un cobaye ou la culture sur cellule.

III Épidémiologie du virus de l'hépatite E

Généralement dues à une source de contamination unique, les épidémies sont brutales et massives d'origine hydrique. Les plus spectaculaires en terme sont observées en Asie [15].

Les principaux foyers du virus de l'hépatite E se situent à New Delhi, en Inde (30 000 cas en 1955), en Birmanie (20 000 cas en 1976 - 1977), au Cachemire en Inde (52 000 cas en 1978), Kânpur en Inde (79 000 cas en 1991) et en Chine (100 000 cas entre 1982 et 1991). Les formes épidémiques touchent deux à trois fois plus d'hommes que de femmes [16].

Dans les pays développés, le virus de l'hépatite E est parfois autochtone, c'est-à-dire que les personnes atteintes n'entrent pas dans les catégories de personnes dites à risque, revenant d'un voyage à l'étranger. Les malades atteints d'une hépatite E sont peu détectés, car devant la rareté de cette maladie et en l'absence de suspicion raisonnable, les services de santé ne pensent pas à cette possibilité. Les voyageurs sont donc exposés dans les régions hyper endémiques pour le VHE, comme le montre une étude italienne récente [17] 81,3% des patients (n=134) ayant présenté une hépatite E aiguë avaient contracté le virus au cours d'un voyage dans une région hyper endémique (surtout en Inde, au Pakistan ou au Bangladesh).

Dans les pays à faible niveau sanitaire d'Asie, d'Afrique, le VHE est hyper-endémique. Les récents foyers épidémiques de VHE au Tchad et au Soudan viennent nous rappeler l'existence de ce problème préoccupant. Sur une période de quatre mois, 6 861 cas suspects ont été recensés d'hépatite E ayant entraîné 87 décès au Soudan et 1 442 cas avec 46 décès au Tchad. Les camps des réfugiés plus peuplés étant les plus touchés [18, 19] Des épidémies ont été signalées en Algérie, en Côte d'Ivoire, au Ghana, en Éthiopie, en Somalie [20] (figure 3).

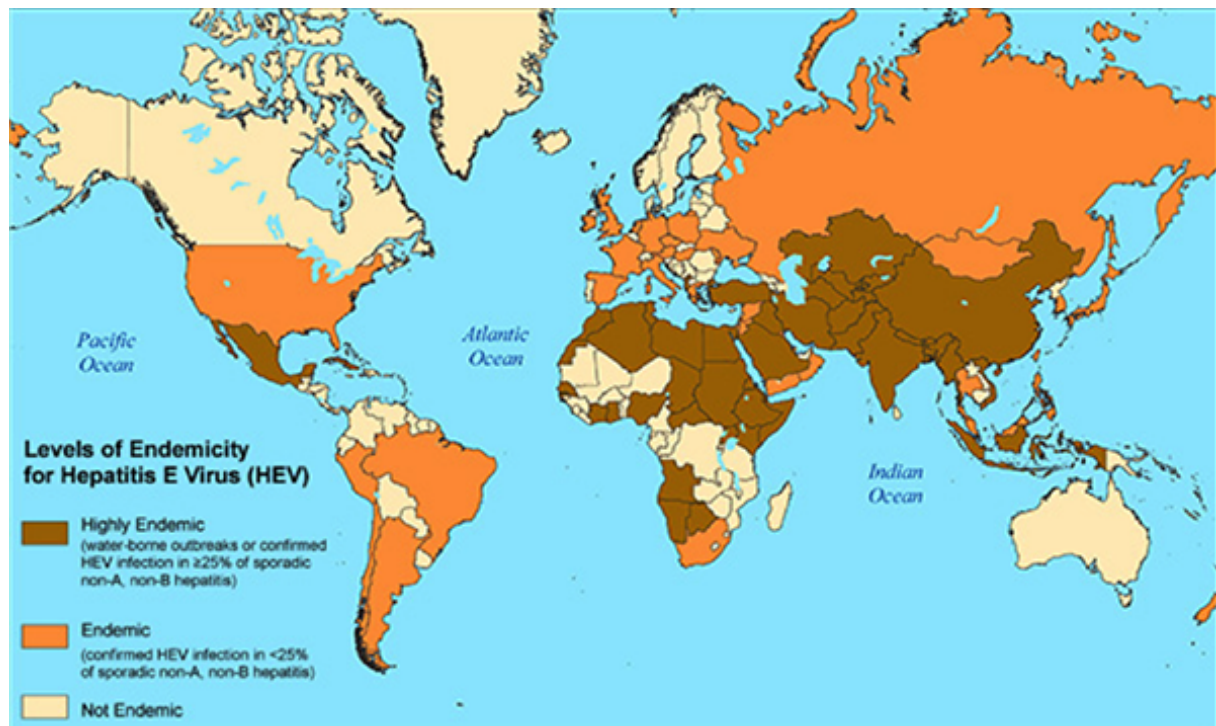


Figure 3 : Distribution mondiale du virus de l'hépatite E[21]

IV. La maladie à virus de l'hépatite E

IV.1 Mode de contamination du virus de l'hépatite E

Quatre modes de transmission de l'infection à VHE ont été signalés : transmission féco-orale, transmission d'origine alimentaire, transmission par le sang et transmission verticale [8, 9].

Le mode de transmission le plus courant du VHE, également responsable de la majorité des éclosions d'infections à VHE, serait la voie féco-orale, généralement par suite de l'ingestion d'eau contaminée. La transmission directe par les mains sales concerne 7 à 20% des personnes de l'entourage du patient excréteur du virus [22].

La transmission d'origine alimentaire est possible : certains cas d'infections à VHE ont résulté de la consommation de viande de sanglier ou de chevreuil crue ou mal cuite [23]. Les études séro-épidémiologiques menées auprès de plusieurs catégories de personnels exposés par leur métier aux animaux domestiques tels que les vétérinaires ont montré un risque plus élevé d'infections dans cette catégorie professionnelle par rapport à une population témoin [24].

La transmission par le sang est rare, mais elle a été établie dans certains cas de transfusions sanguines.

La transmission verticale du VHE a été étudiée lors d'épidémies avec une sévérité accrue de l'hépatite chez la mère et l'enfant. Cette transmission materno-fœtale s'effectue par passage

transplacentaire du VHE pendant la phase aiguë de l'hépatite chez la mère [25]. Elle est majeure au cours du troisième semestre de la grossesse et elle est confirmée par la détection du génome viral dans le sang du cordon et des prélèvements de sang effectués après la naissance [15].

Une transmission nosocomiale dans des structures sanitaires telles que les hôpitaux a été rapportée [26].

La transmission d'une personne à une autre personne, et les cas familiaux secondaires sont rares, en particulier dans des conditions épidémiques (mauvaise hygiène).

Dans les régions non endémiques, où des cas autochtones ont été observés, la transmission zoonotique a été considérée comme le mode de transmission probable, mais d'autres études sur la question sont nécessaires [9].

Au cours de la saison des pluies, une recrudescence des cas d'hépatites aiguës est observée dans les pays tropicaux par débordement des canalisations et court-circuit des réseaux d'approvisionnement d'eau potable et des structures d'assainissement des eaux usées.

IV.2. Formes clinique du virus de l'hépatite E

L'hépatite E peut se présenter sous différentes formes : les formes asymptomatiques sont probablement fréquentes et sont estimées à près de la moitié des cas. Les formes symptomatiques ressemblent beaucoup à celles de l'hépatite A. Après une incubation de 15 à 50 jours, les prodromes associent de façon inconstante, une asthénie fébrile et des troubles digestifs pendant 3 à 7 jours.

Le syndrome ictérique ne diffère pas de celui que l'on observe dans les autres hépatites virales et régresse au bout d'une à 2 semaines [27]. Des formes graves d'hépatite virale E peuvent survenir chez les femmes enceintes plus précisément au cours du troisième trimestre. Elles peuvent aussi survenir chez les personnes immunodéprimées ou des personnes présentant déjà des lésions du foie.

Chez les patients immunodéprimés (patients greffés, patients sous traitement immunosuppresseur, patients présentant une hémopathie, sujets infectés par le VIH, etc.), l'hépatite E peut évoluer vers un portage chronique du virus. On note la détection du génome viral pendant plus de 6 mois, dans 50 à 55% des cas, suivant les séries de patients. Des tableaux de cirrhose documentés ont été observés [28].

V. Diagnostic du virus de l'hépatite E

Le diagnostic de l'infection par le VHE est tout d'abord orienté par la présentation clinique, le contexte épidémiologique ou un séjour datant de moins de 2 mois en pays d'endémie. Dans les zones tempérées, l'hépatite E doit être évoquée devant tout patient présentant un tableau d'hépatite aiguë non A-C, même en l'absence d'antécédents de séjour en zone tropicale. Le diagnostic actuel de l'infection repose sur des critères sérologiques, complétés par la recherche directe de l'agent infectieux en fonction des arguments épidémiologiques.

V.1- Diagnostic direct du virus de l'hépatite E

Le diagnostic actuel repose sur la détection du génome viral par RT-PCR, PCR nichée ou PCR en temps réel à partir de différents échantillons : sérum, selles, biopsie hépatique ou, plus rarement, bile.

Le principe repose sur la combinaison de plusieurs amorces déterminées par alignement de séquences de souches prototypes. Les régions ciblées correspondent aux zones les plus conservées du génome : au niveau de l'ORF1, la partie 5' du gène de la méthyltransférase et le gène de l'ARN polymérase ; au niveau de l'ORF2, la partie centrale, l'extrémité 3', ainsi qu'une partie de l'ORF3.

Bien que le séquençage reste la méthode de référence pour classer les souches, une orientation rapide des génotypes peut être réalisée sur la base d'un polymorphisme de restriction [29]

V.2 Diagnostic indirect du virus de l'hépatite E

Il repose sur la détection par ELISA de marqueurs sérologiques, les anticorps anti VHE de type IgG et IgM. Ces derniers sont détectables dès le début de la symptomatologie avec un taux maximum au bout d'un mois pour décroître ensuite au bout de 2 à 4 mois et 6 mois au maximum pour les IgM. Les IgG persistent de 18 mois à plus de 10 ans suivant les réactifs utilisés [30]. (Figure 4)

Il existe quatre génotypes du VHE qui sont très proches et ne se distinguent guère par leur sérologie [16]. L'infection aiguë est marquée par une augmentation du taux d'immunoglobulines M se normalisant en quelques semaines, suivie par celle des immunoglobulines G spécifiques [31] dont l'élévation indique le caractère ancien de la maladie (figure 4). Cependant, il existe des formes attestant l'hépatite E avec une sérologie par la suite négative [32], ce qui rend le diagnostic rétrospectif difficile d'où une bonne

conservation des prélèvements. Les kits de sérologie disponibles sur le marché ont des sensibilités différentes.

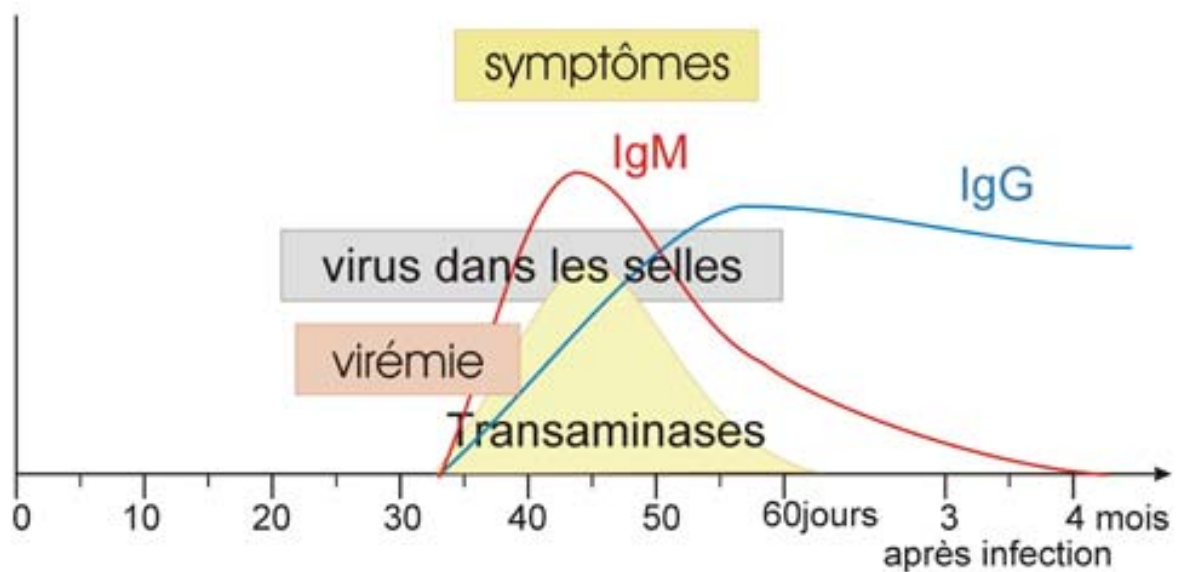


Figure 4 : Évolution des marqueurs sérologiques au cours de l'infection par le VHE [14].

VI. Prévention et traitement

VI.1 Prévention

Dans les régions à bas niveau socio-économique, comme pour tous les agents infectieux transmis par voie féco-orale, la prévention non spécifique repose avant tout sur la disponibilité d'eau potable, l'hygiène individuelle (lavage des mains, éducation sanitaire) et l'utilisation de méthodes de traitement des eaux usées.

Pour le voyageur séjournant dans ces régions, ce sont essentiellement les règles hygiéno-diététiques qui sont les bases de la prévention (consommation de fruits et légumes cuits ou pelés, ébullition d'eau pendant au moins 5 minutes).

Quant aux perspectives vaccinales, un vaccin contre l'hépatite E a été homologué en Chine en 2011.

VI.2 Traitement

Le traitement est symptomatique. Les techniques de réanimation visant à maintenir l'équilibre acido-basique et à corriger le trouble hydro-électrolytique au cours de la phase aiguë a permis de réduire les complications de l'hépatite fulminante et d'améliorer le pronostic pour la mère

et pour l'enfant. Les formes bénignes ne requièrent qu'un simple traitement symptomatique. La ribavirine a été utilisée avec un certain succès sur les formes graves mais l'expérience reste faible [33]. L'interféron-alpha est également utilisé dans les formes chroniques [34]. L'hépatite E régressant généralement spontanément, l'hospitalisation n'est en général pas nécessaire, elle s'impose cependant en cas d'hépatite fulminante particulièrement pour les femmes enceintes. La prévention constitue donc l'approche la plus efficace contre la maladie.

DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

I. Cadre d'étude

Les investigations se sont déroulées dans les districts de Kédougou et de Saraya dans la région de Kédougou située à l'extrême Sud-Est du Sénégal à 12° 33' de latitude Nord et 12° 11' de longitude Ouest. Elle est limitée au Sud par la République de Guinée, et à l'Est par la République du Mali (figure 5). Elle s'étend sur une superficie de 16 896 km² et compte une population de 153 476 habitants. La population est essentiellement rurale (84%), peu scolarisée (27%), et d'une grande diversité ethnique. Les Bassari, les Peulh, les Bédick, et les Malinké, en sont les principaux groupes. Le relief est très accidenté et dépasse par endroit 200 m d'altitude. La région de Kédougou se situe entre les isohyètes 1200 mm et 1300 mm. La saison des pluies y débute selon les années, au mois de mai au plus tard en juin et se poursuit jusqu'au mois de Novembre.

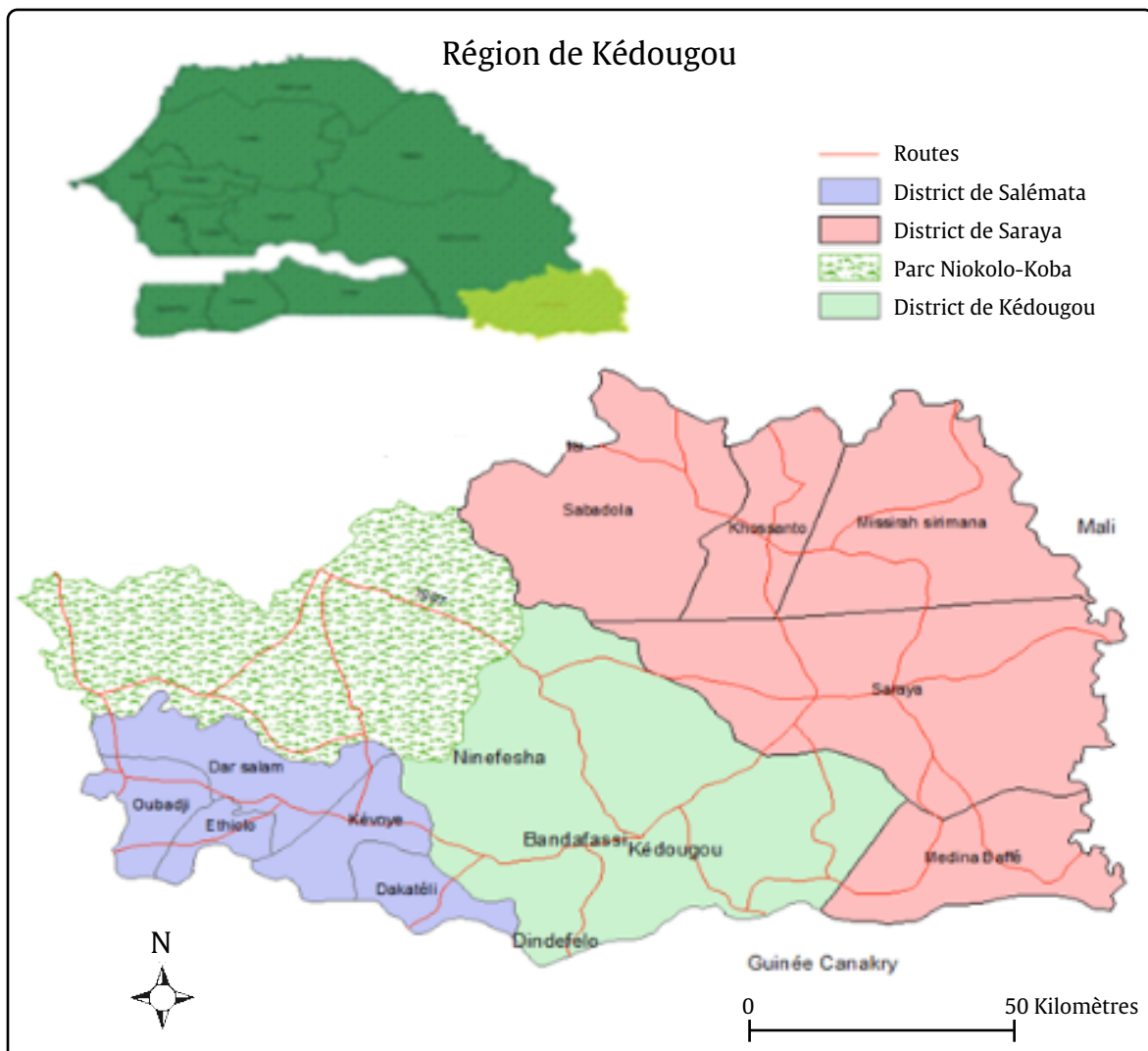


Figure 5 : Carte représentant les districts de Saraya, de Kédougou et de Salémata dans la région de Kédougou.

II. Contexte et justificatif de l'étude

L'équipe de l'IPD en collaboration avec celle de la région médicale de Kédougou ont constaté une augmentation des icteres fébriles associés à des céphalées, une anorexie et des vomissements dans les localités visitées notamment les villages de Kharakhéna, de Tenkoto et de Bantaco qui sont les plus grands sites d'orpaillage de la région. Des formes fulminantes ayant entraîné la mort ont également été notifiées dans ces mêmes villages. En effet tous les patients éligibles suivant les critères d'inclusion déjà établis, ont fait l'objet de prélèvements de sang sur tube sec. Les investigations biologiques par RT-PCR ont permis de confirmer la circulation du VHE dans la région de Kédougou. Cependant seulement 44% (717/1661) des prélèvements collectés lors de l'investigation ont été testés positifs par RT-PCR malgré un grand nombre (944 patients) avec des signes fortement évocateurs de l'hépatite E qui est resté négatif. La RT-PCR demeure un test de détection du virus pendant la phase précoce (aigüe) de l'infection, la réalisation des tests sérologiques (ELISA) complémentaires s'est avérée nécessaire pour évaluer l'ampleur de cette épidémie. C'est dans ce contexte que tous les échantillons qui ont été testés négatifs par RT-PCR, ont été sélectionnés pour une recherche de marqueurs sérologiques (anticorps de type IgM et IgG respectivement marqueurs d'infection récente et tardive de la maladie) (Figure 4).

III. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier l'ampleur de cette épidémie dans les districts de Kédougou et de Saraya où des cas confirmés ont été identifiés.

Les objectifs spécifiques étaient :

De confirmer l'infection par le VHE par les méthodes de diagnostic sérologiques (ELISA) chez des patients présentant une suspicion clinique d'hépatite.

D'identifier les risques liés à cette épidémie, d'évaluer la séroprévalence de l'hépatite E dans la région de Kédougou.

IV. Matériel et méthode

IV.1 Démarche méthodologique

Notre démarche méthodologique consistait à rechercher les marqueurs sérologiques immunoglobulines de type IgM, de type IgG par la technique ELISA. En effet une sélection des échantillons issus de la sérothèque de l'investigation de l'hépatite E dont la PCR en temps

réel est négatif est systématiquement testée en ELISA. Nous avons analysé comparativement l'évolution des marqueurs sérologiques de type IgM et IgG mais aussi la séroprévalence en fonction du sexe, de l'âge, des signes cliniques, du risque d'exposition au VHE et l'origine géographique des cas.

Les résultats statistiques ont été exploités avec le logiciel R. Le logiciel R a été utilisé pour l'analyse descriptive et analytique. La description des variables qualitatives a été réalisée avec la fréquence et l'intervalle de confiance à 95% et celle des variables quantitatives par la moyenne, son intervalle de confiance.

IV.1.1 Type d'étude

Il s'agit d'une étude transversale descriptive à visée analytique qui s'est déroulée de Mars à Mai 2014 et dont la population cible a été constituée par toute personne décédée ou non résidant ou ayant séjourné dans la région de Kédougou durant la période de l'enquête et ayant présenté un ictère fébrile plus un des signes : une asthénie, une anorexie, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales associées ou non à des diarrhées et des manifestations hémorragiques ou toutes personnes vivant au contact d'un cas confirmé ou suspect décédés ou non.

IV.1.2. Protocole d'échantillonnage

IV.1.2.1 Population d'étude

Il s'agit des cas suspects définis comme étant toute personne décédée ou non résidant ou ayant séjourné dans la région de Kédougou durant la période de l'enquête et ayant présenté un ictère fébrile, une asthénie, une anorexie, des nausées vomissements, des douleurs abdominales associées ou non à des diarrhées et des manifestations hémorragiques. Les personnes vivant au contact ou au voisinage de ces suspects ont également été investiguées. En effet parmi les 944 échantillons négatifs, 433 ont été sélectionnés.

IV.1.2.2. Critères d'inclusion

Toute personne suspecte ou contact qui a été testée négative au virus de l'hépatite E par RT-PCR.

IV.1.2.3. Critères de non inclusion

Toute personne suspecte ou non pour laquelle le génome viral du VHE a été retrouvé par RT-PCR.

IV. 1.2.4 Collecte des données et traitement des échantillons

Tous les patients éligibles ayant bénéficié d'un échantillon de sang de 5 ml sur tube sec ont été sélectionnés à partir de la sérothèque (aliquoté et conservé à -80°C) de l'investigation de l'hépatite E dans la région de Kédougou.

Sur le plan épidémiologique, tous ces patients ont fait l'objet d'un entretien individuel à l'aide d'un questionnaire qui a permis de recueillir les données sociodémographiques, les antécédents cliniques et les facteurs d'exposition au VHE.

IV.2 Tests de laboratoire

Matériel

- 1- Papier absorbant jetable pour pailleasse et serviettes en papier.
- 2- Récipient en polypropylène
- 3- Pipette graduée ; 5 ml ,10 ml
- 4- Multipipetteur capable de distribuer des volumes de 50 microlitres et 100 microlitres.
- 5- Pipetteur capable de distribuer des volumes de 1 à 1000microlitres.
- 6- Embout de pipette jetable.
- 7- Réservoirs à réactifs (cuves rectangulaires) d'une capacité de 25 ml.
- 8- Eau distillée de qualité réactive
- 9- Flacon de 500ml, 1000 litres.
- 10- Miltipipette distributeur de volumes de 0.3 ml et un dispositif d'aspiration.
- 11- Un incubateur à 37+- degrés.
- 12- Un testeur de plaque de microtitration à double (A450-A650) .
- 13- Agent désinfectant efficace.
- 14- Film couve- plaque.

REATIFS

- 1- Diluant (**DILUANT SAM**).
- 2- Conjugué de travail dilué au 1/200

- 3- Tampon de lavage dilué (dilution d'un volume de tampon de lavage 20x dans 19 volumes d'eau distillée 1.
- 4- Substrat (TMB)
- 5- Solution d'arrêt (acide chlorhydrique)
- 6- Contrôle positif
- 7- Contrôle négatif

IV.2.1 Test de détection d'anticorps de type IgM par la méthode ELISA

IV.2.1.1 Principe chimiques et biologiques du test HEV IgM ELISA

L'épitope ORF2 hautement conservé a été fixé sur les puits des barrettes des microplaques en polystyrène. Ensuite le sérum ou le plasma humain, dilué dans une solution tampon, est mis en incubation dans les puits ainsi recouverts. Les anticorps spécifiques du VHE, s'ils sont présents, se lient aux antigènes immobilisés sur le support solide. Après incubation, les puits sont abondamment lavés afin d'éliminer les éléments non liés. Des anticorps monoclonaux de souris anti-IgM humains marqués par la peroxydase de raifort sont ajoutés aux puits. Cet anticorps marqué se lie à tout complexe d'anticorps-antigènes précédemment formé. Les anticorps marqués non liés en excès sont éliminés par lavage. Une solution de substrat incolore contenant du TMB (3,3', 5,5'-tetraméthylbenzidine) est ensuite versée dans chaque puits. La présence d'anticorps spécifiques est indiquée par l'apparition d'une couleur bleue après incubation. La couleur vire au jaune lorsque la réaction colorée est arrêtée par l'ajout de d'acide. L'intensité du produit réactionnel jaune est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm et est proportionnelle à la quantité d'anticorps présent dans le prélèvement.

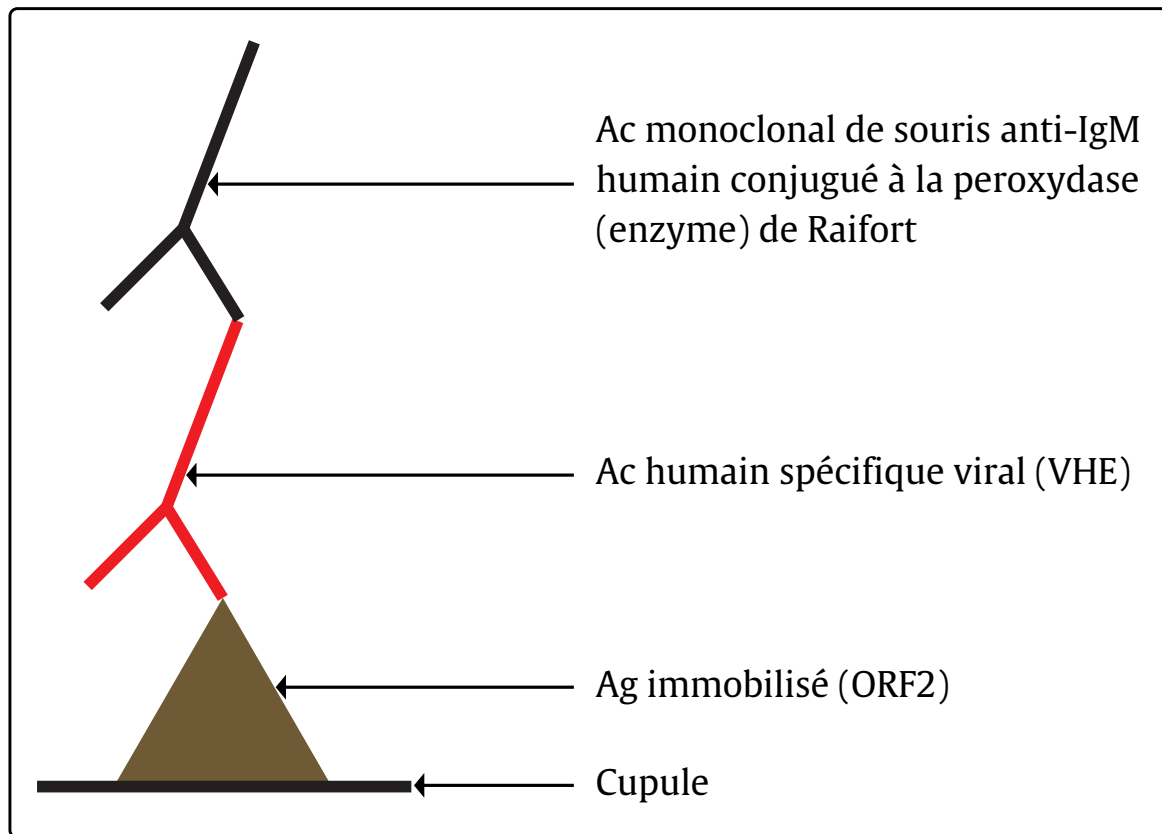


Figure 6 : schéma du principe du test HEV IgM ELISA

IV.2.1.2 Protocole du test HEV IgM ELISA

Première étape : dépôts de sérum ou de plasma.

Après avoir sorti la microplaque de son sachet en aluminium, Secouer les flacons de prélèvements et de contrôle avant utilisation, puis à l'aide d'une pipette à canaux, ajouter 200 μ l de diluant dans tous les puits. Ensuite 10 μ l de chaque spécimen sont ajoutés au puits respectif, en commençant par le puits H1. Ceci permettra d'obtenir une dilution finale du prélèvement de 1/21. Les puits A1 et B1 font office de blanc. 10 μ l de diluant supplémentaire sont ajoutés dans ces puits. Ainsi une fois les prélèvements à analyser ajoutés, ajouter 10 μ l de **contrôle négatif** par puits dans les puits C1, D1, et E1. Ajouter 10 μ l de **contrôle positif** par puits dans les puits F1 et G1. Mélanger soigneusement en tapotant délicatement de chaque côté de la microplaque tout en veillant à ce que la plaque reste bien à plat sur la paillasse. Enfin recouvrir la microplaque avec précaution à l'aide de l'un des films couvre-plaque afin d'éviter toute évaporation pendant l'incubation puis laisser incuber pendant 30 minutes à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (ne pas incuber au bain marie).

Deuxième étape : lavage puis ajout de conjugué de travail.

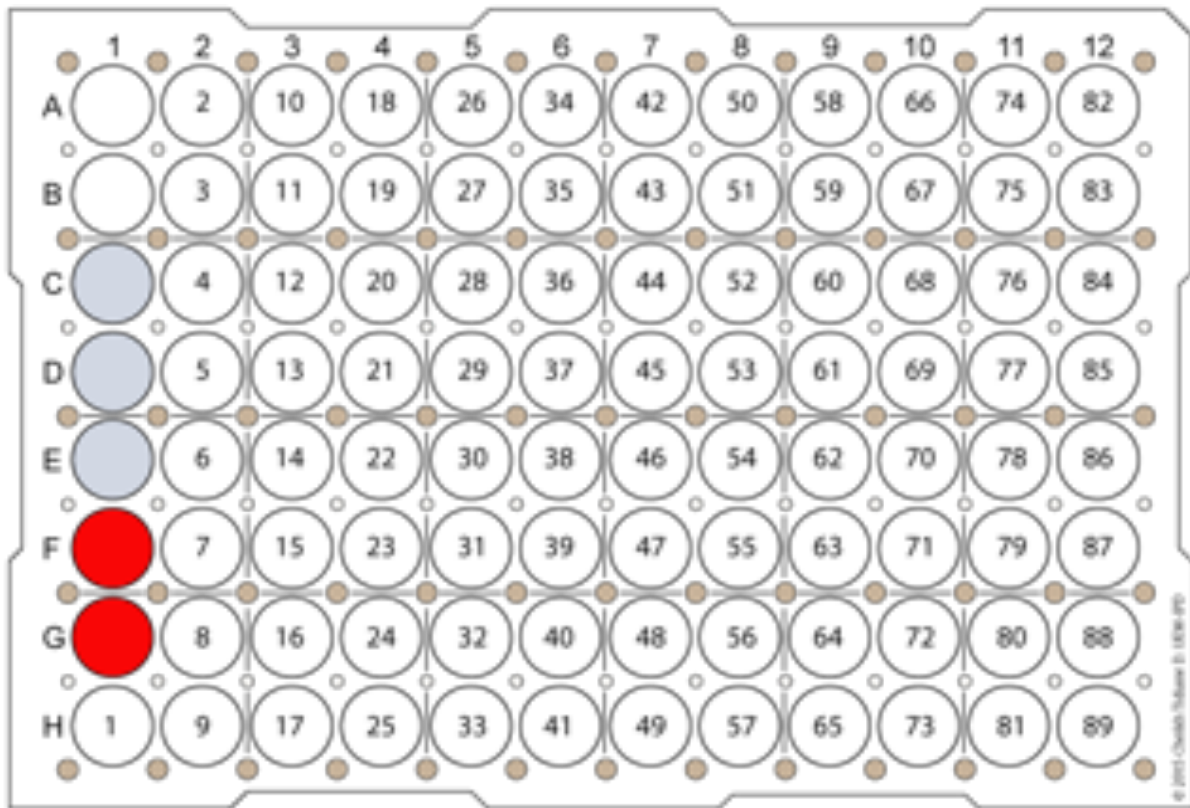
Le film adhésif ayant couvert la plaque est retirée et éliminé. Cette microplaque est lavée à l'aide de tampon de lavage dilué. La totalité du contenu des puits est aspirée en abaissant délicatement l'embout de l'aspirateur jusqu'au fond de ceux-ci. La totalité de la plaque est remplie avec au moins 300 µl/puits. Puis dans le même ordre, le contenu de chaque puits est immédiatement aspiré. Cette étape est répétée six (6) fois. Ensuite après avoir séché la microplaque en la retournant sur un papier absorbant et en tapotant fermement à l'aide d'une pipette à canaux multiples, 100 µl de **conjugué de travail** sont ajoutés dans chaque puits. Un nouveau film adhésif est utilisé pour couvrir la microplaque suivi d'une incubation pendant 30 minutes à 37 °C.

Troisième étape : révélation par un substrat

Le film adhésif a été retiré et jeté. Les étapes de lavages sont répétées comme décrit au niveau de l'étape 3. À l'aide d'une pipette à canaux multiples, 100 µl de **solution de substrat** sont ajoutés dans chaque puits. Un film adhésif est posé sur la microplaque suivie d'une incubation dans l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.

Quatrième étape : arrêt réaction puis lecture.

Le film adhésif est retiré et jeté. À l'aide d'une pipette à canaux multiples, 100 µl de **solution d'arrêt** sont ajoutés dans chaque puits. Puis le contenu des puits est mélangé délicatement en tapotant la plaque. L'absorbance de chaque puits est déterminée à 450 nm sur un appareil utilisant une longueur d'onde double. La longueur d'onde de référence doit être à 620 nm.



A1, B1 = Blanc
 C1, D1, E1 = Contrôle négatif
 F1, G1 = Contrôle positif

Figure 7 : plan de plaque HEV IgM ELISA.

IV.2.1.3 Limites de la méthode HEV IgM ELISA.

Un résultat positif répétitif au test HEV IgM ELISA constitue une preuve présomptive de la présence d'anticorps IgM dirigés contre le VHE dans un prélèvement. Un résultat négatif au test HEV IgM ELISA indique l'absence probable d'IgM anti-VHE détectable dans le prélèvement. Toutefois les données sont insuffisantes pour pouvoir exclure une transmission du VHE aux échantillons contrôlés négatifs au test HEV IgM ELISA. Un résultat négatif ne permet pas d'exclure la possibilité d'une exposition au VHE ou d'une infection. La présence d'un facteur rhumatoïde ou un titre élevé d'IgG n'affecte pas la performance du test HEV IgM ELISA. L'utilisation des méthodes d'élimination des IgG qui nécessitent la dilution de l'échantillon peut affecter la sensibilité du test HEV IgM ELISA.

IV.2.2 Test de détection d'anticorps IgG par la méthode ELISA

IV.2.2.1 Principes chimiques et biologiques du test HEV IgG ELISA

Les puits de la microplaque en polystyrène sont recouverts de trois antigènes recombinants du VHE correspondant aux régions structurales du virus. Les échantillons de sérum ou de plasma humain, dilués dans un tampon diluant, sont mis en incubation dans ces puits recouverts. Les anticorps spécifiques au VHE, s'ils sont présents, se fixeront sur l'antigène VHE immobilisés sur la phase solide. Les puits sont lavés abondamment afin d'éliminer les éléments non fixés et un anti-IgG humain purifié par affinité et marqué à la peroxydase de raifort est ajoutée dans les puits. Cet anticorps marqué se fixera sur tout complexe antigène-anticorps préalablement formé et les anticorps marqués non fixés sont éliminés par lavage. Une solution de substrat incolore contenant du TMB (3,3', 5,5'-tetraméthylbenzidine) est ensuite versée dans chaque puits. La présence d'anticorps spécifiques est indiquée par l'apparition d'une couleur bleue après incubation. La couleur vire au jaune lorsque la réaction colorée est arrêtée par l'ajout de l'acide. L'intensité du produit réactionnel jaune est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm et est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans le prélèvement.

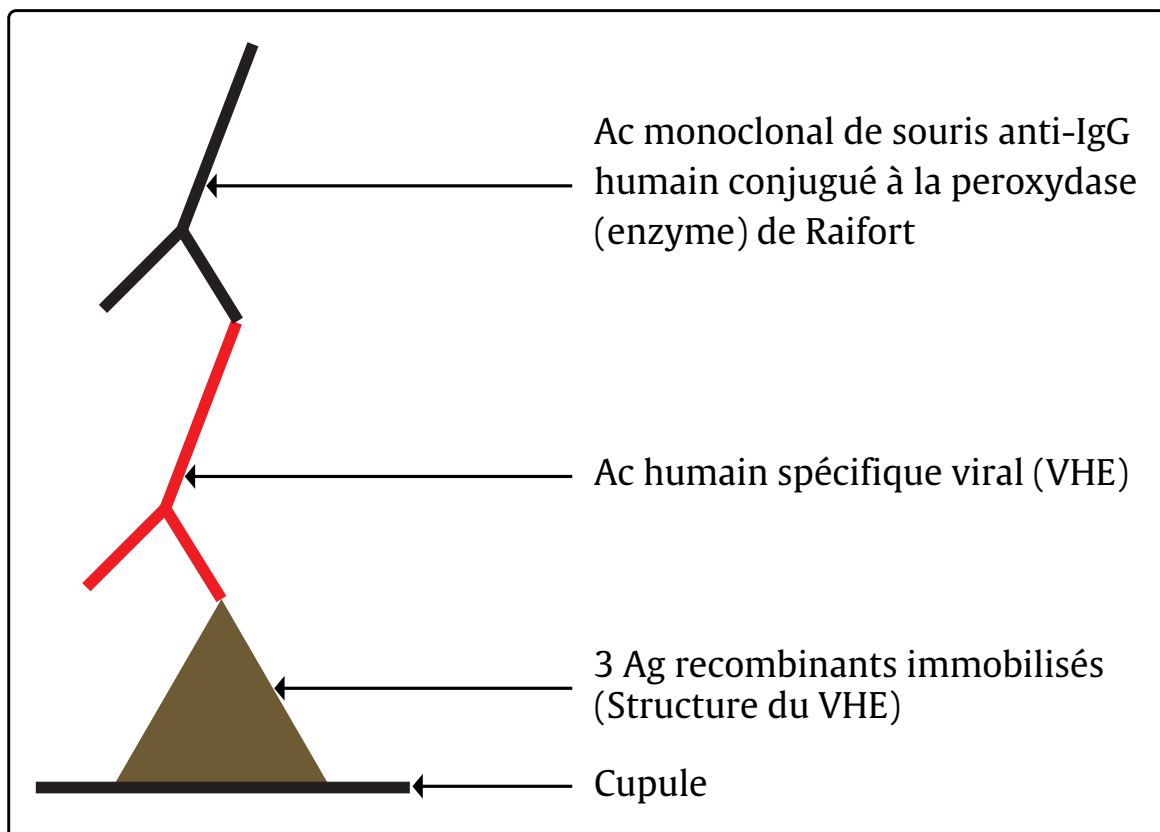


Figure 8 : schéma du principe du test HEV IgG ELISA.

IV.2.2.2 Protocole du test HEV IgG ELISA

Première étape : dépôts de sérum ou de plasma

Après avoir sorti la microplaque de son sachet en aluminium, les flacons de prélèvements et de contrôle sont secoués avant utilisation. Puis à l'aide d'une pipette à canaux, 200 µl de diluant sont ajoutés dans chaque puits. Ensuite 10 µl du spécimen sont ajoutés aux puits désignés à cet effet, en commençant par le puits H1. Ceci permettra d'obtenir une dilution finale du prélèvement de 1/21. Les puits A1 et B1 font office de blanc. 10 µl de diluant supplémentaire sont ajoutés dans ces puits. Ainsi une fois les prélèvements à analyser ajoutés, 10 µl de **contrôle négatif** sont déposés dans les puits C1, D1 et E1. 10 µl de **contrôle positif** sont ajoutés dans les puits F1 et G1. Le contenu de chaque puits est soigneusement mélangé en tapotant délicatement la microplaque tout en veillant à ce que celle-ci reste bien à plat sur la paillasse. Enfin la microplaque est délicatement recouverte à l'aide d'un film adhésif afin d'éviter toute évaporation au cours de l'incubation pendant 30 minutes à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (ne pas incuber au bain marie).

Deuxième étape : lavage puis ajout de conjugué de travail.

Le film adhésif est retiré et jeté, puis la microplaque est lavée à l'aide du tampon de lavage dilué. La totalité du contenu des puits est aspirée en abaissant délicatement l'embout de l'aspirateur jusqu'au fond de chaque puits. La totalité de la plaque est remplie avec au moins 300 µl/puits. Puis dans le même ordre, le contenu de chaque puits est immédiatement aspiré. Cette étape est répétée six (6) fois. Ensuite après avoir séché la microplaque en la retournant sur un papier absorbant et en tapotant fermement, 100 µl de conjugué de travail sont ajoutés dans chaque puits à l'aide d'une pipette à canaux multiples. Un nouveau film adhésif est posé sur la microplaque puis laissé incuber pendant 30 minutes à 37°C .

Troisième étape : révélation par un substrat

Le film adhésif est retiré et jeté. Les étapes de lavages ont est répétées comme décrit au niveau de l'étape 2. À l'aide d'une pipette à canaux multiples, 100 µl de solution de substrat sont ajoutés dans chaque puits. Un film adhésif est posé sur la microplaque suivi d'une incubation dans l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.

Quatrième étape: arrêt réaction puis lecture.

Le film adhésif est retiré et jeté. À l'aide d'une pipette à canaux multiples, 100 µl de **solution d'arrêt** sont ajoutés dans chaque puits. Puis le contenu des puits a été mélangé délicatement en tapotant la plaque. L'absorbance de chaque puits est déterminée à 450 nm sur un appareil

utilisant une longueur d'onde double. La longueur d'onde de référence doit être à 620 nm.(cf figure 7)

IV.2.2.3 Limites de la méthode HEV IgG ELISA.

Les résultats positifs de façon répétée au test HEV IgG ELISA indiquent la possible présence d'anticorps IgG dirigés contre le VHE dans un prélèvement. Un résultat négatif au test HEV IgG ELISA signale l'absence probable d'IgG anti-VHE détectables dans le prélèvement. Un résultat négatif ne permet pas d'exclure la possibilité d'une exposition au VHE ou d'une infection. La possibilité de résultats faussement positifs doit être prise en compte avec la trousse d'analyse de ce type. La proportion de faux positifs dépend de la sensibilité et de la spécificité de la trousse d'analyse. Pour la plupart des tests de dépistage, plus la prévalence de l'anticorps est élevée, plus la proportion de faux positifs est réduite.

RESULTATS ET DISCUSSION

V. RÉSULTATS

V.1 Description de la population d'étude

Durant l'investigation 433 échantillons ont été sélectionnés provenant de 238 sujets contacts (55%) et de 195 cas suspects (45%). L'âge médian était de 19 ans et le sexe ratio (M/F) était de 1,9. La moyenne d'âge des hommes (24,8 ans) était significativement plus élevée que celle des femmes (17,9 ans) ($p < 0,000001$) (Figure 9).

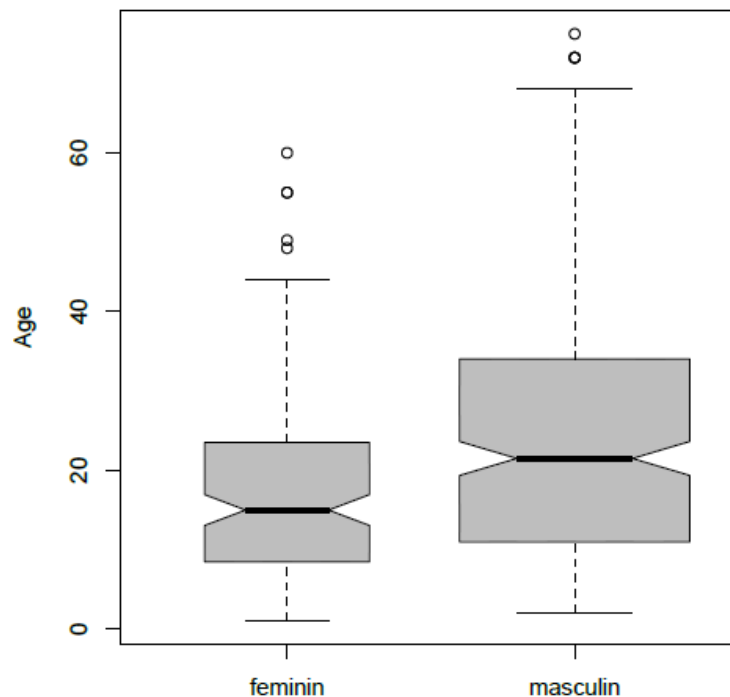


Figure 9 : description de l'âge en fonction du sexe de la population d'étude

La répartition des patients selon leur origine géographique montre qu'ils sont surtout originaires de la commune de Kédougou (36,2%) et des sites d'orpaillage (40,8%) notamment Bantaco, Kharakhena et Tenkoto qui sont les principaux villages d'orpaillage de la région avec un afflux massif de migrants autochtones et étrangers (Figure 10).

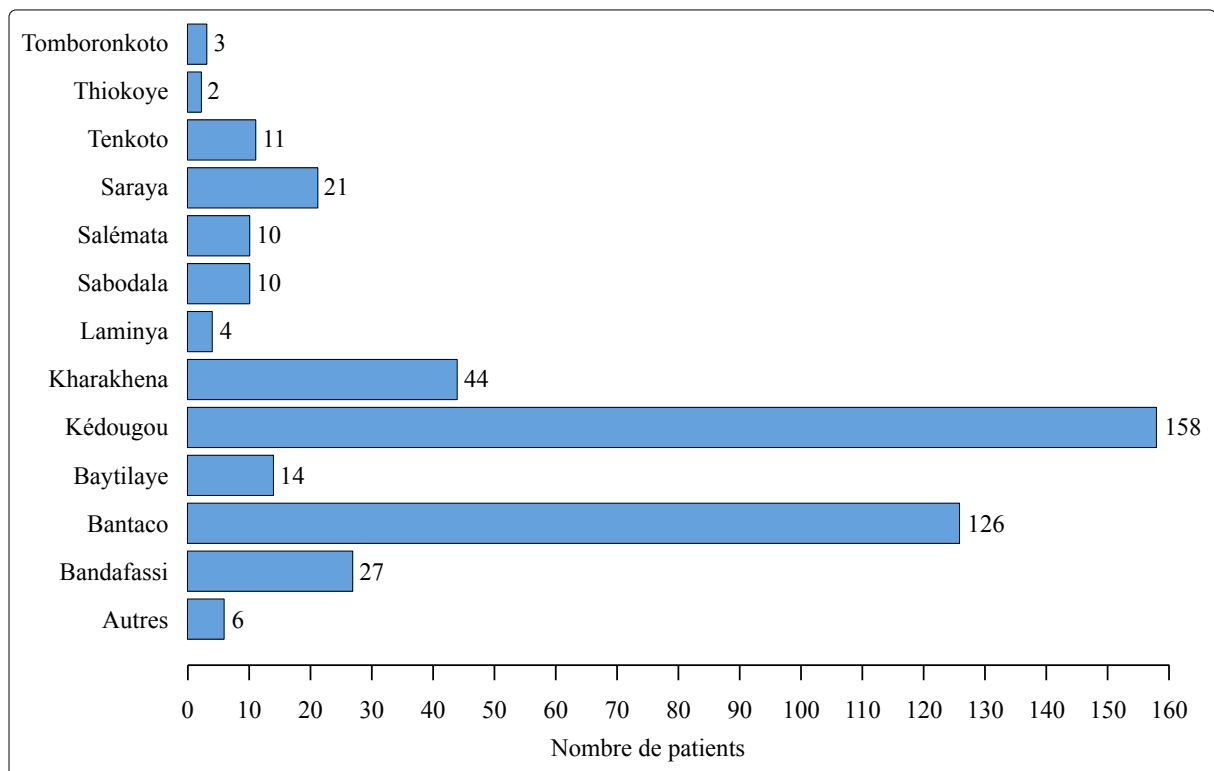


Figure 10 : distribution des patients par origine géographique

V.2. Séroprévalence de l'hépatite E

V.2.1. Séroprévalence en fonction de l'âge, du sexe et du risque d'exposition au VHE

Les analyses sérologiques (ELISA) ont permis de montrer que 38,8% des patients (168 sujets) étaient porteurs d'anticorps de type IgM témoignant d'une infection récente au virus de l'hépatite E tandis que 27,5% (119 sujets) ont présenté des anticorps de type IgG marqueurs d'une exposition ancienne au VHE. Cependant 18,7% (81 sujets) étaient concomitamment testés positifs aux deux tests sérologiques.

Tableau I : Séroprévalence du virus de l'hépatite E, selon l'âge, le sexe et l'exposition au cours de l'investigation dans la région de Kédougou.

	VHE IgM		VHE IgG	
	n (%)	p-value	n (%)	p-value
Tranches d'âge (Ans)				
<15	42(25,0)		16(13,4)	
16-30	73(43,4)		55(46,2)	
31-45	34(20,2)	5,3.10 ⁻⁶	31(26,0)	3,75 .10 ⁻¹¹
>45	19(11,3)		17(14,2)	
Total	168 (100)		119(100)	
Sexe				
M	121(72)		92 (77,3)	
F	047(28)	0,004	27 (22,7)	0,003
Total	168(100)		119(100)	
Statut				
Cas contacts	48(28,5)		28(23,5)	
Cas suspects	120(71,4)	2,2 10 ⁻¹⁶	91(76,4)	1,9.10 ⁻¹⁵
Total	168(100)		119(100)	

Le tableau 1 montre que la séroprévalence des anticorps anti-IgM de l'Hépatite E des patients âgés de [16-30 ans] (43,4%) était significativement plus élevée comparativement à celles des autres tranches d'âge avec 25% chez les moins de 15 ans, 20,2% pour ceux âgés de [31-45 ans] et 11,3% chez les plus de 45 ans ($p=5,3.10^{-6}$).

De même la prévalence des anticorps de type IgG était significativement plus élevée chez les patients âgés de [16-30 ans] ($p=3,75 .10^{-11}$).

La figure 11 montre le risque d'exposition à l'infection récente à l'hépatite E. En effet le risque d'exposition au VHE est trois (3) fois plus grande chez les 15-30 ans comparé à la classe des ≤ 15 ans. De même le risque d'exposition est trois fois plus grande chez les 31-45ans comparé à la classe des ≤ 15 ans.

Les mêmes tendances ont été retrouvées pour la séroprévalence (Ac-IgG) qui était de 77,3% chez les hommes et de 22,7% chez les femmes ($p=0,003$). Le risque d'exposition à l'infection

récente à l'hépatite E chez les hommes était significativement plus élevé que celui des femmes avec un OR de 1,56 [1,0-2,4] (Figure 12).

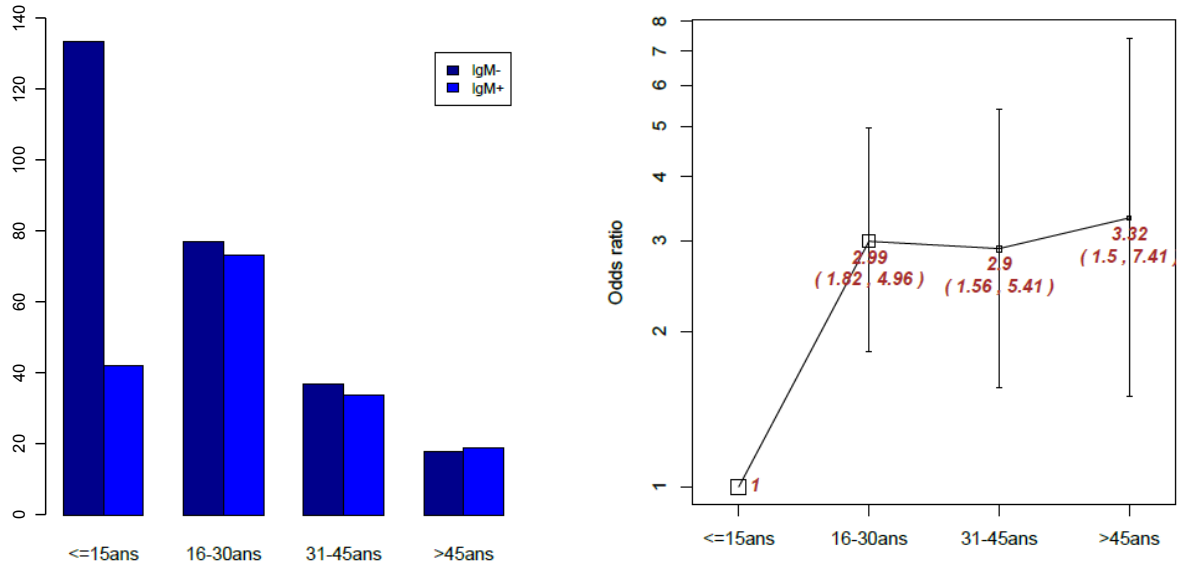


Figure 11 : Distribution de l'hépatite E (AC-anti-VHE) et le risque d'exposition en fonction de l'âge.

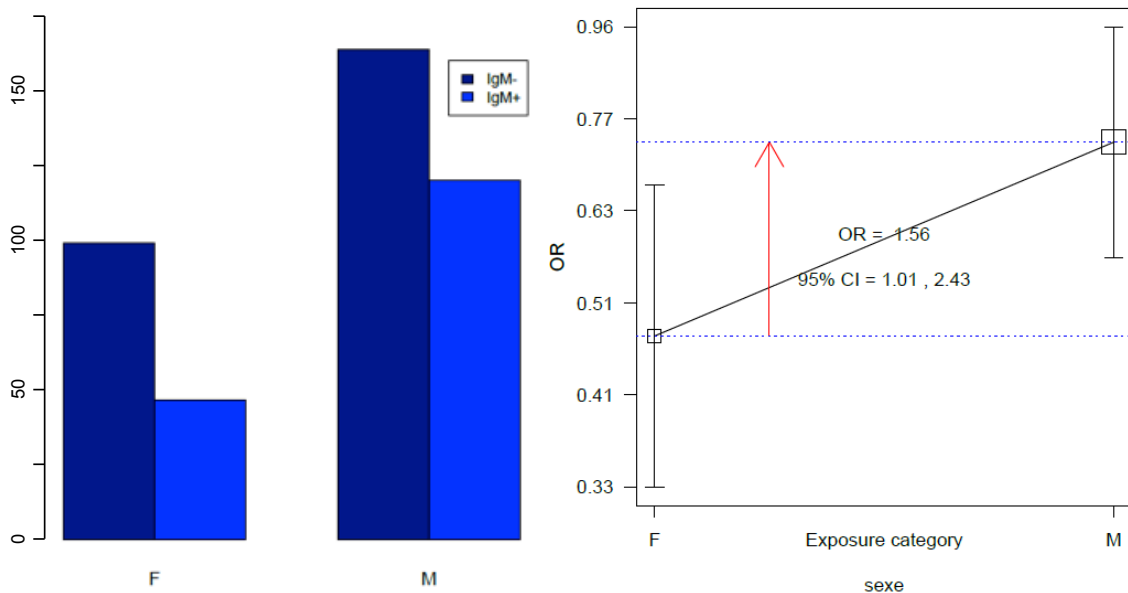


Figure 12 : Distribution de l'hépatite E (AC-anti-VHE) et le risque d'exposition en fonction du sexe.

V.2.2. Séroprévalence en fonction de l'origine géographique

Le tableau 2 montre la séroprévalence du VHE selon l'origine géographique des patients. La zone de Baytilaye, de Kédougou, Saraya, de Thiokoye et Salemata qui ont respectivement des séroprévalences de 42,4% ; 78,5%; 57,1%; 50,0% et 60,0% restent significativement élevées. La zone de Bantaco, celles de Tenkoto, Kharakhena et Sabodala qui constituent les plus grands sites d'orpillage de la région de Kédougou, restent significativement élevées avec respectivement des séroprévalence de 81,8 ; 38,6 et 80.0%. Cependant le district de Salemata l'emporte largement avec une séroprévalence de 60,05 suivi du district de Saraya 49,3% et enfin le district de Kédougou 35,9%.

Tableau II : Séroprévalence sur la population selon l'origine géographique.

		séroprévalence		
	Villages	Echantillons testés	n (%)	p-value
Kédougou	Bandafassi	27	06 (22,2)	1.88 10 ⁻⁶
	Bantaco	126	28 (22,2)	
	Baytilaye	14	11 (78,5)	
	Kédougou	158	67 (42,4)	
	Lamina	4	01 (25,0)	
	Tenkoto	11	09 (81,8)	
	Thiokoye	2	01 (50,0)	
Total	District Kédougou	342	123(35,9)	
Saraya	Kharakhena	44	17 (38,6)	0.043
	Sabodala	10	08 (80,0)	
	Saraya	21	12 (57,1)	
	Total	District Saraya	75	
Salemata	Salémata	10	06(60,0)	
Total	District Salémata	10	06(60,0)	

V.2.3- Analyse de la symptomatologie clinique

Sur le plan clinique, au cours de l'investigation, 195 cas suspects avaient présenté une symptomatologie clinique. Parmi les patients positifs à l'hépatite E, nous avons 118 cas de fièvre (70,2%), 11 cas d'hémorragie (6,5%), 32 cas de vomissements (19%) et 79 cas d'ictère (47%) (Tableau 3). En effet l'analyse univariée a montré que les individus présentant une fièvre, des vomissements, et un ictère et dont la tranche d'âge est comprise entre 16-30 ans, 31-45 ans et plus 45 ans étaient significativement associés à l'infection au VHE. Par contre l'analyse multivariée montre que les individus présentant un ictère et une fièvre et dont la

tranche d'âge est comprise respectivement entre 16-30 ans et 31-45 ans avaient plus de chance de développer l'hépatite E que ceux qui ont moins de 15 ans. Par ailleurs 15 patients parmi les suspects à l'infection au VHE, ont présenté des hémorragies de type otorragie, épistaxis, hématomèse, ménorragie, hématurie, selles sanglantes (figure 13) et parmi les 15 patients, 11 sont positifs à l'hépatite E. L'étude a permis de montrer que parmi les 168 cas positifs 4 sont décédés soit une létalité de 2,3%.

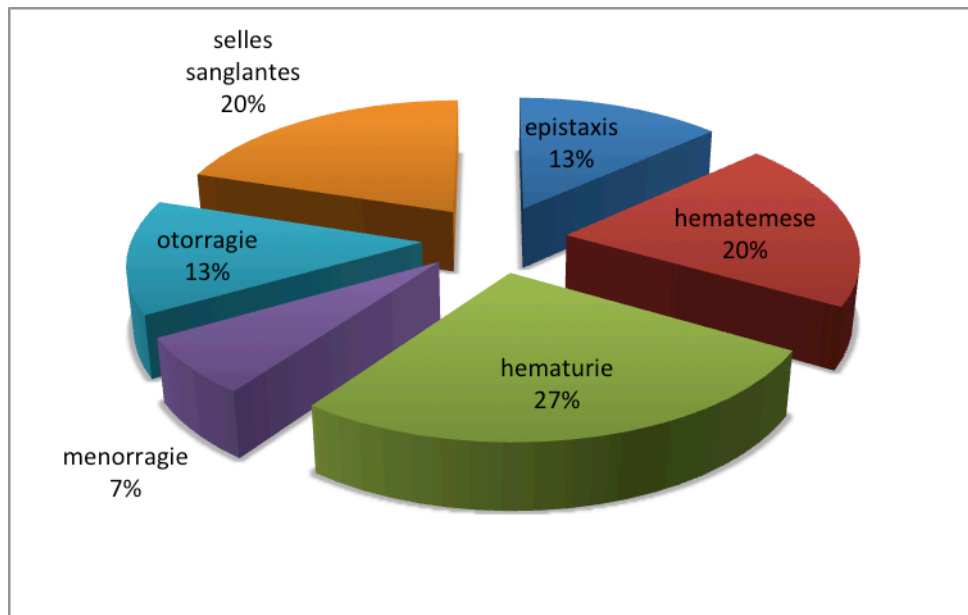


Figure 13 : Représentation schématique des différents types d'hémorragies

Tableau III : Analyses univariée et multivariée des résultats selon l'âge, le sexe et les signes cliniques.

	n(%)	Analyse univariée		Analyse multivariée	
		OR [IC 95%]	p-value	OR [IC 95%]	p-value
Tranche d'âge réf ≤15 ans					
16-30	73(43, 5%)	2,16[1,2 3,7]	0,0049	2,17 [1,2 3,7]	0,004
31-45	34(20,2%)	1,94[1,0 3,7]	0,0476	1,95 [1,0 3,8]	0,045
>45	19(11,3%)	2,06[0,8 4,7]	0,085	2,07 [0,9 4,7]	0,082
Sexe réf = F					
M	121(72%)	1,56[1,0 2,4]	0,037	0,07 [0,2 0,3]	0,754
Signes cliniques					
Fièvre	118(70,2%)	4,06[2,6 6,1]	0,0001	2,28 [1,3 3,9]	0,002
Vomissement	32 (19,0%)	1,80[1,0 3,1]	0,02	0,90 [0,4 1,8]	0,777
Hémorragie	11 (6,50%)	4,53[1,5 16,5]	0,01	1,49 [0,4 6,0]	0,530
Ictère	79 (47,0%)	5,57[3,5 8,9]	0,0001	2,64 [1,4 4,7]	0,001

DISCUSSION

Dans notre étude, 433 échantillons dont les tests de recherche du virus par PCR étaient négatifs, ont été sélectionnés. Les anticorps de type IgM témoin d'une infection récente, restent largement majoritaires par rapport aux anticorps de type IgG qui quant à eux sont témoins d'une infection ancienne. Ce rapport IgM/IgG qui reste significativement très élevé, nous laisse penser que cette épidémie est nouvelle. En plus les 81 individus qui ont pu développer à la fois les anticorps de type IgM et IgG viennent nous conforter dans notre hypothèse. L'analyse biologique a aussi montré que parmi les 433 échantillons sélectionnés et qui étaient tous négatifs à la PCR, un total de 287 échantillons est positif en sérologie ELISA. Ceci s'explique par le fait que la PCR est un test dont le rôle est la détection et reste efficace que lorsque le patient est dans une phase précoce de la maladie. Par contre lorsqu'un patient est dans la phase de production d'anticorps dirigés contre un microbe, le test approprié reste l'ELISA. Ainsi les résultats sérologiques qui semblent être très significatifs, nous montrent l'importance de la sérologie concernant l'évaluation de l'ampleur réelle d'une épidémie d'hépatite E. En conséquence pour mieux évaluer l'ampleur réelle d'une épidémie de l'hépatite E, la réalisation de la sérologie ELISA en complémentarité à la PCR semble être nécessaire.

Sur les 168 sujets testés positifs en IgM, 4 sont décédés, soit 2,3% de cette population. Ce résultat est conforme aux données épidémiologiques de l'OMS qui indiquent que le taux de mortalité due à l'hépatite E sur l'ensemble de la population varie entre 0,5 et 4%[1]. Il est à signaler que parmi ces décès, figurent deux femmes enceintes qui sont toutes décédées soit un pourcentage de 100% constaté chez ces dernières. Même si dans notre étude cette statistique semble être très élevée et différente de celles déjà publiées, nous restons unanimes sur la gravité due à l'infection à virus de l'hépatite E notamment chez les femmes enceintes. Ainsi en termes de gravité, plus particulièrement chez la femme enceinte, nos résultats corroborent les travaux de Chandra *et al.* [2] qui montrent que les femmes enceintes sont plus susceptibles aux formes compliquées de la maladie entraînant un taux de mortalité de 20% chez ces dernières et ce qui fait de l'infection à virus de l'hépatite E la plus grave de toutes les hépatites virales pendant la grossesse. Parmi les patients dont la sérologie IgM est positif, 11 présentaient des hémorragies de type otorragie, épistaxis, hématomèse, ménorragie, hématurie, selles sanglantes (figure 13). En effet, en terme d'hémorragie nos résultats ne

corroborent pas à ceux obtenus lors de travaux publiés antérieurement sur la symptomatologie du virus de l'hépatite E [2, 11, 20, 27].

Cependant l'analyse multivariée montre que les sujets présentant seulement un ictère et une fièvre, et dont la tranche d'âge est comprise respectivement entre 16 et 45 ans avaient plus de chance de développer l'hépatite E. L'infection symptomatique est plus répandue chez les jeunes adultes âgés de 15 à 45 ans. En effet même si dans notre cas l'analyse multivariée n'a pas montré l'importance des signes évocateurs de l'hépatite E tel que l'anorexie (perte d'appétit), douleurs abdominales, sensibilité à la palpation, nausées et vomissements, nous remarquons que nos résultats corroborent les données épidémiologiques de l'OMS [32] en termes d'ictère et de fièvre.

Les analyses biologiques nous permettent de constater que les hommes sont plus exposés que les femmes aux virus de l'hépatite E soit 72% de cas positif en IgM chez les hommes contre 28% chez les femmes avec un odds ratio de 1,6 [1,01 2,43]. Ce déséquilibre homme/femmes en termes d'exposition à l'hépatite E est d'autant plus important qu'il nous laisse penser aux travaux de Kamar *et al.* [16] qui montrent que les formes épidémiques touchent deux à trois fois plus d'hommes que de femmes.

L'analyse statistique montre que les individus dont les tranches d'âge étaient comprises entre 16-30 ans et 31-45 ans étaient significativement plus exposés avec respectivement 73 cas positifs en sérologie IgM soit 43,4% et 34 cas positifs en sérologie IgG soit 20,2% comparé aux individus dont la tranche d'âges est inférieure à 15 ans. Ceci peut s'expliquer par le fait que dans les zones où nous avons constaté le plus de cas positifs en sérologie notamment dans les zones de Bantaco, Tenkoto et Kharakhena, qui constituent les plus grands sites d'orpaillages traditionnel de la région de Kédougou, des individus qui y travaillent, étaient majoritairement âgés de 15 à 45 ans. Il est aussi à signaler que dans ces zones citées plus haut, où l'orpaillage traditionnel est très développé, les conditions d'hygiènes sont très médiocres et l'accès à l'eau potable constitue un problème majeur. En effet en terme de séroprévalence, à l'exception du village de Baytilaye, nous avons noté une absence totale d'hygiène avec des conditions de vie précaire, dans les plus grands sites d'orpaillages traditionnel tels que la zone de Bantaco, Tenkoto et Kharakhena qui ont connu les épidémies les plus spectaculaires du virus de l'hépatite E. Cependant le village de Baytilaye avec une séroprévalence de 78,5% reste très significatif. Même si dans ce village de Baytilaye, les conditions de vie sont meilleures que celles au niveau des plus grands sites d'orpaillage traditionnel, cette séroprévalence de 78,5% s'explique par le fait que dans la zone de Baytilaye, la population est majoritairement constituée d'agriculteurs et que l'agriculture demeure la principale source de

survie. Ainsi pendant la saison sèche presque toute la population active se déplace quotidiennement vers les plus grands sites d'orpaillage où l'infection a débuté. C'est probablement dans ces zones d'orpaillage que les populations de Baytilaye ont pu être infectées. En outre il est à signaler que ce phénomène de la ruée à la recherche de l'or vers les plus grands sites d'orpaillage est courant et ceci explique l'élévation de la séroprévalence des zones comme Sabodala, Bandafassi, Laminya, Thiokoye et Salemata. Dans la ville de Kédougou la séroprévalence reste aussi significativement importante ceci s'explique par le phénomène de migration (zone d'orpaillage vers la ville de Kédougou) causé par la fermeture des mines d'or traditionnelles. En effet depuis la fermeture des sites d'orpaillage qui abritaient des populations venant de Kédougou et partout d'Afrique, y'a eu un déplacement de ces derniers vers la ville de Kédougou. En outre comme la ville de Kédougou abrite le centre santé de référence, la majorité des patients infectés par le VHE préfèrent venir à Kédougou à la recherche d'une meilleure prise en charge.

CONCLUSION

Vue la gravité de l'hépatite E notamment chez la femme enceinte, au Sénégal et plus particulièrement à Kédougou, le virus de l'hépatite E doit être suspecté devant toute hépatite aigue inexpliquée, même en dehors d'une notion de voyage en zone endémique et surtout si elle survient sur un patient de plus de 40 ans. Bien qu'il n'y ait pas de traitement étiologique de cette maladie, les populations vulnérables notamment les femmes enceintes et les personnes âgées devraient particulièrement être surveillées concernant la détection et la prise en charge précoce afin d'éviter une forte mortalité. Afin d'évaluer l'ampleur réelle de cette épidémie de l'hépatite E, le diagnostic doit se reposer sur la détection d'anticorps dirigés contre le VHE mais doit être confirmé par détection du virus dans le sang et dans les selles par la PCR en temps réel. En effet, il faut sensibiliser les populations sur les modes de propagation du VHE et les mesures d'hygiène usuelles telles que le lavage systématique des mains à la sortie des toilettes, avant de préparer le repas, après contact avec des animaux vivants ou des produit d'origine animale, utiliser des latrines propres, couvrir les puits. Ensuite il faut aussi approvisionner les populations en eau potable dans les sites d'orpillage en mettant en place de nouveaux forages et en mettant aussi au niveau des ménages des dispositif de purificateurs d'eau. Enfin améliorer les systèmes d'assainissement et de gestion des ordures et des eaux usées dans les sites d'orpillage où les puits, les fosses septiques et les dépôts d'ordure cohabitent dans un même espace favorisant ainsi le maintien et la propagation de cette épidémie. Faire cuire les aliments d'origine animale avant de les consommer. En cas de contact avec la carcasse ou des animaux vivant tels que le porc, le sanglier, le cerf dans le cadre des activités professionnelles ou de loisir, respecter les bonnes pratique d'hygiène et de formation (hygiène des mains, de la tenue et des locaux).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS, *Hépatite E, aide-mémoire N°280* Juin 2014.
2. Chandra, V., S. Taneja, M. Kalia, and S. Jameel, *Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus*. Journal of biosciences, 2008. **33**(4): p. 451-464.
3. *Vaccin chinois contre l'hépatite E : L'OMS envisage son utilisation en cas d'épidémie dans un pays en développement*. 24/06/2015; Available from: <https://www.mesvaccins.net/web/news/6914-vaccin-chinois-contre-l-hepatite-e-l-oms-envisage-son-utilisation-en-cas-d-epidemie-dans-un-pays-en-developpement>.
4. Viswathanan, R., *Infectious hepatitis in Delhi (1955–56): a critical study*. Epidemiology. Indian J. Med. Res, 1957. **45**: p. 1-30.
5. Balayan, M., A. Andjaparidze, S. Savinskaya, E. Ketiladze, D. Braginsky, A. Savinov, and V. Poleschuk, *Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route*. Intervirology, 1983. **20**(1): p. 23-31.
6. *L'hépatite E : Généralités et diagnostic biologique.*; Available from: <http://www.interlab81.fr/pdf/Hepatitis%20E.pdf>.
7. Denis, F., *Les virus transmissibles de la mère à l'enfant*. 1999.
8. Mushahwar, I.K., *Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention*. Journal of medical virology, 2008. **80**(4): p. 646-658.
9. Aggarwal, R. and S. Naik, *Epidemiology of hepatitis E: current status*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2009. **24**(9): p. 1484-1493.
10. Aggarwal, R., *Hepatitis E: epidemiology and natural history*. Journal of Clinical and Experimental Hepatology, 2013. **3**(2): p. 125-133.
11. Kuno, A., K. Ido, N. Isoda, Y. Satoh, K. Ono, S. Satoh, H. Inamori, K. Sugano, N. Kanai, and T. Nishizawa, *Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus*. Hepatology research, 2003. **26**(3): p. 237-242.
12. Hiroz, P., *Mise à jour sur l'hépatite E*. Gastroentérologie, 2013. **396**(29): p. 1594-1598.
13. McCaustland, K., K. Krawczynski, J. Ebert, M. Balayan, A. Andjaparidze, J. Spelbring, E. Cook, C. Humphrey, P. Yarbough, and M. Favorov, *Hepatitis E virus infection in chimpanzees: a retrospective analysis*. Archives of virology, 2000. **145**(9): p. 1909-1918.
14. *Le virus de l'hépatite E, espace étudiant : cours de virologie systématique*. [cited 2015 06/06/2015]; Available from: www.microbes-edu.org/etudiant/hepatiteE.html.
15. Tsarev, S.A., T.S. Tsareva, S.U. Emerson, M.K. Rippy, P. Zack, M. Shapiro, and R.H. Purcell, *Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV*. Journal of Infectious Diseases, 1995. **172**(1): p. 31-37.
16. Kamar, N., R. Bendall, F. Legrand-Abravanel, N.-S. Xia, S. Ijaz, J. Izopet, and H.R. Dalton, *Hepatitis E*. The Lancet, 2012. **379**(9835): p. 2477-2488.
17. Bru, J.-P., *Hépatite oubliée: l'hépatite E*. Médecine des voyages, 2012. **340**(18): p. 986-988.
18. World Health Organization. *Communicable disease surveillance and response (CSR), Hepatitis E in Chad*. 2004 [cited 2015 2015/03/18]; Available from: http://www.who.int/csr/don/2004_08_10/en/.

19. World Health Organization. *Communicable disease surveillance and response (CSR), Hepatitis E in Sudan*. 2004 [cited 2015 2015/03/18]; Available from: http://www.who.int/csr/don/2004_08_19/en/.
20. Panda, S.K., D. Thakral, and S. Rehman, *Hepatitis E virus*. *Reviews in medical virology*, 2007. **17**(3): p. 151-180.
21. Kamar, N., R. Bendall, F. Florence Legrand-Abravanel, and e. al., *Hepatitis E*. *Lancet*, 2012. **379**(9835): p. 2477-88.
22. Aggarwal, R. and S.R. Naik, *Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread*. *Journal of hepatology*, 1994. **21**(5): p. 718-723.
23. Matsubayashi, K., J.H. Kang, H. Sakata, K. Takahashi, M. Shindo, M. Kato, S. Sato, T. Kato, H. Nishimori, and K. Tsuji, *A case of transfusion - transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food - borne route*. *Transfusion*, 2008. **48**(7): p. 1368-1375.
24. Banks, M., R. Bendall, S. Grierson, G. Heath, J. Mitchell, and H. Dalton, *Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom*. *Emerging infectious diseases*, 2004. **10**(5): p. 953.
25. Kamili, S., J. Spelbring, D. Carson, and K. Krawczynski, *Protective efficacy of hepatitis E virus DNA vaccine administered by gene gun in the cynomolgus macaque model of infection*. *Journal of Infectious Diseases*, 2004. **189**(2): p. 258-264.
26. Robson, S., S. Adams, N. Brink, B. Woodruff, and D. Bradley, *Hospital outbreak of hepatitis E*. *The Lancet*, 1992. **339**(8806): p. 1424-1425.
27. Krawczynski, K., *Hepatitis E*. *Hepatology*, 1993. **17**(5): p. 932-941.
28. *l'hépatite E : Généralités et diagnostic biologique*.
29. Buisson, Y., M. Grandadam, E. Nicand, P. Cheval, H. van Cuyck-Gandre, B. Innis, P. Rehel, P. Coursaget, R. Teyssou, and S. Tsarev, *Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria*. *Journal of General Virology*, 2000. **81**(4): p. 903-909.
30. Nicand, E. and M. Grandadam, *Virus de l'hépatite E*. *Virologie*, 2003. **7**(2): p. 87-96.
31. Huang, S., X. Zhang, H. Jiang, Q. Yan, X. Ai, Y. Wang, J. Cai, L. Jiang, T. Wu, and Z. Wang, *Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E*. *PLoS One*, 2010. **5**(10): p. e13560.
32. Mansuy, J.M., J.M. Peron, C. Bureau, L. Alric, J.P. Vinel, and J. Izopet, *Immunologically silent autochthonous acute hepatitis E virus infection in France*. *Journal of clinical microbiology*, 2004. **42**(2): p. 912-913.
33. Dalton, H.R., *Hepatitis: hepatitis E and decompensated chronic liver disease*. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2012. **9**(8): p. 430-432.
34. Kamar, N., F. Abravanel, C. Garrouste, I. Cardeau-Desangles, J.M. Mansuy, H. Weclawiack, J. Izopet, and L. Rostaing, *Three-month pegylated interferon-alpha-2a therapy for chronic hepatitis E virus infection in a haemodialysis patient*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2010: p. gfg282.

ANNEXE 1 : conditions de vie des population de Kharahena



Titre : Étude de la Séroprévalence dans un Contexte Épidémique du Virus de l'Hépatite E dans la Région de Kédougou

Prénom et Nom du Candidat : Bakary Djilocalisse SADIO

Mémoire de Master II en Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Jury : Président : Pr Cheikh Saad Bouh BOYE (UCAD)

Membres : Pr Gora MBAYE (UCAD)

Dr Babacar MBENGUE (UCAD)

Dr Abdel Kader NDIAYE (IPD)

Directeur de mémoire : Dr Amadou Alpha SALL (IPD)

Co-directeur de mémoire : Dr Abdourahmane SOW, Dr Abdou Kader Ndiaye (IPD)

Soutenu le 29 mars 2016

Résumé :

L'hépatite E est une maladie virale du foie provoquée par le virus de l'hépatite E (VHE). Elle est favorisée par les conditions de vie précaire et une absence d'hygiène. Les principaux foyers se situent en Asie, en Afrique et en Amérique centrale.

Observé pour la première fois en microscope électronique en 1983 dans les selles des patients atteints d'hépatite non-A et non B, le virus de l'hépatite E a été identifié de façon formelle par le clonage de son génome(VHE) en 1990. Le virus de l'hépatite E (VHE) est un virus non enveloppé, à ARN monocaténaire à polarité positive (7,5 kb) récemment classé dans la famille des *Hepeviridae*, genre *hepevirus*. Son génome comprend trois cadres de lecture : ORF1, ORF2, ORF3. Ainsi il pénètre dans l'organisme par voie digestive et gagne le foie où il se multiplie et les hépatocytes semblent être le site de réplication de son génome. Son réservoir principal reste l'homme. Quatre modes de transmission de l'infection à VHE ont été signalés: transmission féco-orale, transmission d'origine alimentaire, transmission par le sang et transmission verticale. Le diagnostic actuel de l'infection repose sur des critères sérologiques (diagnostic indirect), complétés par la recherche directe de l'agent infectieux en fonction des arguments épidémiologiques (diagnostic indirect).

Notre démarche méthodologique consistait à rechercher les marqueurs sérologiques immunoglobulines de type IgM, de type IgG par la technique Elisa. En effet une sélection des échantillons issus de la sérothèque de l'investigation de l'hépatite E dont la PCR en temps réel est négatif est systématiquement testée en ELISA. Nous avons analysé comparativement l'évolution des marqueurs sérologiques de type IgM et IgG mais aussi la séroprévalence en fonction du sexe, de l'âge, des signes cliniques, du risque d'exposition au VHE et répartition géographique des cas. Les résultats statistiques ont été exploités avec le logiciel R. Vu la gravité de l'hépatite E notamment chez la femme enceinte, au Sénégal et plus particulièrement à Kédougou, le virus de l'hépatite E doit être suspecté devant toute hépatite aigüe inexplicée, même en dehors d'une notion de voyage en zone endémique et surtout si elle survient sur un patient de plus de 40 ans.

Mots-clés : Séroprévalence - Hépatite E – Kédougou – IgG - IgM