



HAL
open science

Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à virus de l'hépatite B en République Centrafricaine

Claudine Bekondi

► **To cite this version:**

Claudine Bekondi. Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à virus de l'hépatite B en République Centrafricaine. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10129 . tel-01748381

HAL Id: tel-01748381

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748381>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1

2007

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 22 janvier 2008

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ – NANCY 1**

Discipline : Génomique

Par **Claudine BEKONDI**

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies « Biologie - Santé »

Sujet :

**ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES
INFECTIONS A VIRUS DE L'HEPATITE B EN
REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE**

Directeurs de thèse : Monsieur le Professeur Alain LE FAOU

Madame le Professeur Chantal FINANCE

JURY

Monsieur le Professeur Nikolaus MÜLLER-LANTZSCH (Rapporteur)

Madame le Professeur Françoise STOLL-KELLER (Rapporteur)

Monsieur le Professeur Claude P. MULLER (Examineur)

Monsieur le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI (Examineur)

Madame le Docteur Marie-Annick BUENDIA (Examineur)

DEDICACE.....	v
REMERCIEMENTS	vi
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	x
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	xiv
LISTE DES TABLEAUX	xvi
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.1. HISTORIQUE.....	5
1.1.1. Découverte du virus de l'hépatite B.....	5
1.2. LES <i>HEPADNAVIRIDAE</i>	7
1.2.1. Taxonomie.....	7
1.2.2. Particules du VHB : formes circulantes	8
1.2.3. Structure du virion.....	10
1.2.4. Propriétés physico-chimiques	11
1.2.5. Le génome du VHB	11
1.2.5.1. Organisation du génome.....	12
– Cadres de lecture	12
– Séquences régulatrices et éléments structuraux	14
Séquences régulatrices.....	14
Éléments structuraux	14
1.2.6. Les protéines virales.....	16
1.2.6.1. Protéines de surface (ou d'enveloppe)	16
1.2.6.2. Protéine de la capsidite et la protéine Précore.....	18
1.2.6.3. Polymérase	19
1.2.6.4. Protéine X.....	20
1.2.7. La multiplication du virus	21
1.2.7.1. Culture <i>in vitro</i> et modèles animaux	21
1.2.7.2. Tropisme cellulaire.....	21
1.2.7.3. Cycle viral	22
– Entrée du virus.....	22
Attachement.....	22
Récepteur du VHB	23
Fusion	24
– Migration vers le noyau et décapsidation.....	24
– Synthèse des ARNm.....	25
– Reconstitution de la particule virale et réplication du génome viral	26
– Bourgeonnement et sécrétion des particules virales.....	27
1.2.8. La variabilité du génome du VHB	28
1.2.8.1. Conséquences de la variabilité génomique du VHB	29
– Mutations du gène préS/S.....	29
Sérotypes	29
Génotypes	30
– Mutants antigène HBs (-) ou mutants d'échappement à la vaccination	31
– Mutations du gène <i>préC/C</i> et les hépatites sans AgHBe.....	33
– Mutations du gène <i>P</i> et la résistance au traitement	35
– Mutations du gène <i>X</i> et le carcinome hépatocellulaire.....	36

1.3. EPIDEMIOLOGIE.....	37
1.3.1 Répartition mondiale.....	37
1.3.2. Modes de transmission.....	38
1.3.2.1. Transmissions parentérale et nosocomiale.....	39
1.3.2.2. Transmission sexuelle.....	40
1.3.2.3. Transmission verticale (périnatale ou materno-fœtale).....	40
1.3.2.4. Transmission horizontale.....	41
1.3.3. Histoire naturelle.....	42
1.4. POUVOIR PATHOGENE CHEZ L’HOMME.....	43
1.4.1. Physiopathologie.....	43
1.4.1.1. Hépatite B aiguë.....	44
– Incubation.....	44
– Phase d’état.....	44
– Guérison.....	45
– Formes cliniques.....	45
Hépatite asymptomatique.....	45
Hépatite fulminante.....	45
1.4.1.2. Hépatite B chronique.....	45
– Portage inactif.....	46
– Hépatite B chronique persistante.....	46
– Hépatite B chronique active.....	47
– Complications de l’hépatite B chronique.....	47
Cirrhose virale B.....	47
VHB et carcinome hépatocellulaire.....	47
1.5. DIAGNOSTIC DE L’HEPATITE B AU LABORATOIRE.....	51
1.5.1. Diagnostic Direct.....	52
1.5.1.1. Culture.....	52
1.5.1.2. Microscopie électronique.....	53
1.5.1.3. Recherche des antigènes viraux.....	53
1.5.1.4. Détection et quantification de l’ADN du VHB.....	53
– Indications de la recherche de l’ADN viral.....	54
1.5.2. Diagnostic indirect.....	54
1.5.3. Cinétique des marqueurs.....	55
1.5.3.1. Au cours d’hépatites aiguës d’évolution favorable.....	55
1.5.3.2. Au cours d’hépatites chroniques.....	57
1.6. PREVENTION ET TRAITEMENT.....	58
1.6.1. Mesures préventives générales.....	58
1.6.2. Immunothérapie passive par les immunoglobulines spécifiques anti-HBs.....	59
1.6.3. Vaccination contre l’hépatite B.....	59
1.6.4. Traitements curatifs.....	61
1.6.4.1. But du traitement.....	62
1.6.4.2. Immunomodulateurs.....	62
– Interféron-alpha (IFN α).....	62
– Interféron pégylé ou Pegasys®.....	64
– Transfert passif de l’immunité antivirale B.....	65
1.6.4.3. Analogues nucléosidiques.....	65
– Vidarabine (adénine 5’monophosphate).....	65

– Inhibiteurs de la transcriptase inverse	66
Lamivudine ou Zeffix® (ou 3TC)	66
Adefovir dipivoxyl ou Hepsera®	68
Ténofovir	68
Entécavir ou Baraclude®.....	69
– Autres analogues nucléosidiques.....	70
1.6.4.4. Associations thérapeutiques	71
1.6.4.5. Vaccinothérapie.....	71
1.6.4.6. Autres stratégies antivirales	71
1.6.4.7. Transplantation hépatique	72
1.5. VIRUS DE L’HEPATITE DELTA (VHD) OU AGENT DELTA.....	72
1.5.1. Caractéristiques du virus	73
1.5.1.1. Structure	73
1.7.1.2. Génome	73
1.7.1.3. Variabilité génétique du virus	74
1.7.1.4. Protéines virales	74
1.7.1.5. Multiplication	75
1.7.2. Epidémiologie	75
1.7.3. Pouvoir pathogène.....	76
1.7.3.1. Co-infection.....	76
1.7.3.2. Surinfection	77
1.7.3.3. VHD et carcinome hépatocellulaire	77
1.7.4. Diagnostic virologique de l’hépatite delta	78
1.7.4.1. Diagnostic direct	78
1.7.4.2. Diagnostic indirect	79
1.7.5. Traitement et prévention de l’hépatite delta.....	79
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	81
2.1. MATERIEL UTILISE POUR LES ETUDES MOLECULAIRES	82
2.1.1. Produits chimiques et tampons.....	82
2.1.2. Appareillage	83
2.1.3. Petit matériel	84
2.1.4. Amorces pour les PCR.....	85
2.1.4.1. Au laboratoire de virologie de Nancy	85
2.1.4.2. Au laboratoire National de Santé de Luxembourg.....	85
2.1.4.3. Au laboratoire des Hépatites virales à l’Institut Pasteur de Bangui.....	86
2.2. MATERIEL UTILISE POUR LE PRELEVEMENT DES PATIENTS	87
2.2.1. Matériel de prélèvement sanguin	87
2.2.2. Matériel et produits utilisés pour la réalisation de la cytoponction	88
2.2.3. Echographie.....	88
2.3. METHODES	88
2.3.1. Première population	88
2.3.1.1. Cadre d’étude	88
2.3.1.2. Patients	89
2.3.1.3. Sérologie.....	90
2.3.1.4. Détermination de la charge virale	90
2.3.1.5. Extraction de l’ADN viral	91

2.3.1.6. Amplifications géniques et purification des amplicons	91
2.3.1.7. Séquençage.....	93
2.3.1.8. Clonage.....	94
2.3.1.9. Analyse des séquences	95
2.3.2. Deuxième population (VHB et CHC).....	96
2.3.2.1. Cadre d'étude	96
2.3.2.2. Patients	97
2.3.2.3. Prélèvements	97
– Prélèvements sanguins.....	97
– Cytoponction hépatique.....	98
2.3.2.4. Analyses	98
– Sérologie.....	98
– Examens cytologiques	99
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	100
3.1. RESULTATS	101
3.1.1. Etude de la première population	101
3.1.1.1. Etude des marqueurs sérologiques du VHB.....	101
3.1.1.2. Analyse des séquences et génotypage.....	103
– Mutations observées dans le gène S	104
– Mutations observées dans la région PréS2	104
– Mutations observées dans les régions PréC et X.....	105
3.1.1.4. Analyses phylogénétiques et détermination des génotypes	106
– Analyse basée sur la région S.....	106
– Analyse basée sur la région PréC/C.....	108
– Analyse basée sur le génome complet.....	110
– Détermination des sous-groupes des souches de génotypes A et D....	112
Analyse à partir de la région S	112
Analyse de la souche RCA177 basée sur la région PréC/C	115
3.1.1.5. Recherche d'infections mixtes et recombinaisons	117
3.1.2. Descriptions cliniques et biologiques des patients atteints de CHC	119
3.1.2.1. Données sociodémographiques	120
3.1.2.2. Principaux signes cliniques observés chez les patients	120
3.1.2.3. Bilan de l'échographie abdominale des patients	121
3.1.2.4. Caractéristiques biologiques des patients.....	123
3.1.2.5. Etude des marqueurs du VHB et du VHD	123
3.1.2.6. Résultats des examens cytopathologiques.....	125
3.1.2.7. Concordance du diagnostic échographique et de la cytologie	126
3.2. DISCUSSION	127
CHAPITRE 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	132
REFERENCES	135
ANNEXES : PUBLICATIONS ET TRAVAUX	157

DEDICACE

A MES FILLES

Ophélie et Maéva, mes deux plus grandes joies de vivre, pour toutes ces années passées loin de vous alors que vous aviez si besoin de moi.

Je vous dédie ce mémoire.

A MES PARENTS

Angèle et Jean-Pétras, qui ont donné tout ce qu'ils pouvaient pour que je sois là aujourd'hui.

Soyez honorés pour tous vos efforts.

A MES FRERES ET SCEURS, NEVEUX ET NIECES

Toute mon affection et mon amour. Eudoxie et Charlerine, je ne vous oublierai jamais.

A TOUTE MA FAMILLE

Toute ma gratitude

REMERCIEMENTS

Mon parcours pour arriver à cette étape finale de la préparation de ma thèse de doctorat a été plutôt long et difficile. Mais loin de me décourager de la recherche, ce cheminement m'a donné le genre de force que l'on gagne à avoir su surmonter les difficultés. J'ai maintenant acquis la conviction profonde d'avoir choisi la bonne voie.

Evidemment, je n'en suis pas arrivée là toute seule et je tiens ici à remercier tous ceux qui m'ont aidée et soutenue, de près ou de loin, dans ce long travail.

Je tiens avant tout à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Alain Le Faou (Directeur de l'Institut Pasteur de Bangui, République Centrafricaine), pour m'avoir donné l'occasion de commencer ce travail en m'accueillant dans le laboratoire de Virologie du CHU de Brabois à Nancy qu'il dirigeait. Il m'a offert la chance de travailler dans le domaine qui m'intéresse et je lui en serai toujours reconnaissante.

Je remercie tout particulièrement Madame le Professeur Chantal Finance (Doyen de la Faculté de Pharmacie. UMR 7565, Nancy Université) pour avoir accepté, dans des conditions difficiles, la co-direction de ce travail de thèse malgré ses multiples obligations professionnelles. Sa générosité, sa ténacité, et surtout sa capacité à gérer le stress forcent mon admiration plus que je ne saurais l'exprimer.

Je remercie Madame le Professeur Françoise Stoll-Keller (Faculté de Médecine, Institut de Virologie, Université de Strasbourg) et Monsieur le Professeur Nikolaus Müller-Lantzsch (Chef du Laboratoire de Virologie, Université de Hombourg, Allemagne) de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail. Vos compétences, vos critiques ainsi que vos suggestions nous aideront à parfaire ce manuscrit. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus haute considération.

Je remercie Monsieur le Professeur Claude P. Muller (Chef du Laboratoire National de la Santé, Luxembourg) et Monsieur le Docteur Christophe Olinger (Département d'Immunologie, laboratoire National de la Santé, Luxembourg) pour leur aide précieuse dans la réalisation du génotypage et des analyses phylogénétiques de certaines des souches de virus de l'hépatite B.

Je tiens aussi à remercier Madame le Docteur Marie-Annick Buendia (Unité d'Oncogénèse et Virologie Moléculaire, INSERM U579, Institut Pasteur, Paris) pour ses conseils qui nous permettront de mieux envisager la poursuite de nos travaux et, Monsieur le Professeur Jean-Pierre Bronowicki d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie Madame le Docteur Monoven (Service Commun de Biologie Moléculaire, CHU de Nancy, Hôpital Brabois) pour la synthèse des amorces nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je remercie de tout mon coeur Monsieur le Docteur Antoine Talarmin (Ancien Directeur de l'Institut Pasteur de Bangui, actuellement Directeur de l'Institut Pasteur de Madagascar) pour m'avoir encouragée à commencer cette aventure. Antoine, trouve ici toute ma reconnaissance et mon amitié.

Un grand merci également à Monsieur le Docteur Raphaël Duval (UMR 7565, Nancy Université - CNRS, GEVSM) pour son aide si précieuse dans le domaine informatique et pour sa capacité d'écoute et pour ses encouragements. Qu'il sache que j'ai beaucoup appris à ses côtés.

Je tiens également à remercier à l'Hôpital de l'Amitié : Monsieur le Docteur Timothée Mobima et Monsieur le Docteur Magloire Odio (Service de radiologie et d'Imagerie Médicale) pour la réalisation des échographies et des cytoponctions hépatiques ; Monsieur le Docteur Jean-Omer Ouavènè (Service d'hépto-gastro-entérologie) et Monsieur le Docteur Vincent Sénékian (Service des Urgences et de Réanimations Médicales) pour le recrutement et l'inclusion des patients. Notre collaboration a été très fructueuse, me donnant ainsi l'occasion d'entrer dans le monde complexe et fascinant de la médecine avec tous ces termes que je trouvais...« barbares ». Merci aussi d'avoir été là pour répondre à mes questions.

Un grand merci également à Monsieur le Docteur Boniface Koffi (Laboratoire National de Biologie Clinique et de Santé Publique, Bangui) pour la réalisation des examens cytopathologiques.

J'exprime toute ma gratitude à mes collègues Narcisse Komas, Ionella Gouandjika, Emmanuel Nakoune, Thierry Frank, Djibrine Djallé, Sandrine Moussa, Fanny Lingoupou, Alexandre Manirakiza pour leurs encouragements ; avec une pensée émue pour Eric Kassa-Kelembho qui n'est plus parmi nous.

Les personnes que j'ai côtoyées quotidiennement dans les différents laboratoires m'ont apportée énormément de support, qu'il soit d'ordre technique ou moral. Merci, à toutes les techniciennes du service de sérologie et de biologie moléculaire du laboratoire de Virologie, du CHU de Nancy pour leur gentillesse et leur disponibilité sans oublier Mmes Pierrette Bocquillon (Secrétaire Médicale) et Mauricette Chouquet (Surveillante du Service de Virologie du CHU de Nancy).

Merci à tous les techniciens de laboratoire d'Analyses Médicales de l'Institut Pasteur de Bangui pour la réalisation de la sérothèque, des analyses biologiques et de la sérologie des patients.

Merci à Josiane, Julienne, Pulchérie (Laboratoire des Rétrovirus, Institut Pasteur de Bangui) et à Xavier (Laboratoire des Arbovirus, Rage, Grippe, Institut Pasteur de Bangui) pour leur soutien moral et leurs encouragements.

Merci aux surveillantes de laboratoires d'analyses médicales : Mmes Marie-Françoise Coumanzi et Marie-Joëlle Mandeng qui s'arrangeaient pour que j'obtienne rapidement les résultats des analyse des patients.

Merci à Mme Adriana Zengais (Secrétariat de la comptabilité) pour avoir mis à notre disposition toute la logistique nécessaire pour l'acheminement des prélèvements au niveau des laboratoires et le rendu des résultats des patients aux médecins.

Merci à toute l'équipe du GEVSM qui participe à faire de ce service un endroit plein de vie: Francine, Raphaël, Chloé, Marion, Stéphane, Niad, Aurélie ; sans oublier Catherine (Secrétariat) pour la coordination de tous les courriers relatifs à la réalisation de ce travail. Merci pour tout Catherine.

Il me faut aussi remercier tous ceux qui font partie de ma vie ou qui l'on traversée au fil des années. Comme ils ne sont pas tous susceptibles de lire ces pages un jour, je ferai en sorte de les remercier en personne. Mais je veux ici souligner l'influence de personnes qui me sont chères. Merci à mes parents, Angèle et Jean-Pétrus, de m'avoir donné tout ce qu'ils pouvaient et surtout de m'avoir encouragé à poursuivre mes études dans un pays où très peu de femmes envisagent de poursuivre des études supérieures. Merci à ma grand-mère Denise, à mes frères et sœurs, à mes neveux et nièces, pour tout ce qu'ils m'ont apportée d'écoute et de réconfort.

Un grand Merci à Paule et Marie-Reine Hennequin pour leur soutien à la réalisation de ce travail, avec une pensée émue pour le père Charles Tisserant.

Ce travail définitivement n'aurait été possible sans le financement du Ministère des Affaires Etrangères du Gouvernement Français et le Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France en Centrafrique, à travers une bourse (EGIDE).

Sans vous, je ne serai pas la personne que je suis aujourd'hui.

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

aa	Acide aminé
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNccc	ADN circulaire covalamment clos
AFB1	Aflatoxine B1
Ag	Antigène
AgHBc	Ag de la capsid («core») du virus de l'hépatite B
AgHBe	Ag «e» du virus de l'hépatite B
AgHBs	Antigène de surface du virus de l'hépatite B
AgHD	Antigène delta
ALAT	Alanine aminotransférase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Anti-HBc	Anticorps dirigé contre la protéine core du virus de l'hépatite B
Anti-HBe	Anticorps dirigé contre la protéine E du virus de l'hépatite B
Anti-HBs	Anticorps dirigé contre la protéine de surface du virus de l'hépatite B
Anti-HD	Anticorps dirigé contre les protéines delta (LHD, sHD)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNpg	ARN pré-génomique
ASAT	Aspartine aminotransférase
BET	Bromure d'éthidium
CD	Classe de différenciation
CHC	Carcinome hépatocellulaire
ChHBV	Chimpanzee Hepatitis B Virus (virus de l'hépatite B du Chimpanzé)

CHO	Chinese Hamster Ovary : cellules d'ovaire d'hamster chinois
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
DHBV	Duck Hepatitis B Virus (virus de l'hépatite B du canard)
dNTPs	Désoxynuléotides triphosphates (ATP, TTP, CTP, GTP)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylene–Diamine–Tetra–Acetic acid
GiHBV	Gibbon Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B du Gibbon)
GoHBV	Gorilla Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B du Gorille)
gp	Glycoprotéine
GSHBV	Ground Squirrel Hepatitis B Virus (virus de l'hépatite B de l'écureuil)
HBx	Protéine X du virus de l'hépatite B
HHBV	Heron Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B du héron)
HLA	Human Leucocyte antigen (Ag de leucocytes humains)
IFN α	Interféron-alpha
IgHB	Immunoglobulines spécifiques anti-HBs
IgM	Immunoglobuline de type M
IgG	Immunoglobuline de type G
IPB	Institut Pasteur de Bangui
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
km	Kilomètre
L	Grande protéine (L = large) d'enveloppe du virus de l'hépatite B
LHD	Grande protéine du virus de l'hépatite delta
LNBCSP	Laboratoire National de Biologie Clinique et de Santé Publique
M	Protéine moyenne (M = médium) d'enveloppe du virus de l'hépatite B

mg/k/j	Milligramme par kilogramme de poids par jour
MgCl ₂	Chlorures de magnésium
min	Minute
mL	Millilitre
mM	Millimole
MST	Maladies sexuellement transmissibles
nm	Nanomètre
nM	Nanomole
nt	Nucléotide
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)
OuHBV	Orang-outang Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B du Oran-outang)
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PEG-IFN α -2a	IFN-pégylé-alpha-2a
pmol	Picomole
RCA	République Centrafricaine
RE	Réticulum endoplasmique
S	Protéine majeure (S = Small) d'enveloppe du virus de l'hépatite B
SGHBV	Snow Goose Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B de l'Oie)
sHD	Petite protéine du virus de l'hépatite delta
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience acquise
TP	Terminal protein ou protéine terminale
UI/L	Unité Internationale par litre
UV	Ultra violet

VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHD	Virus de l'hépatite Delta ou agent Delta
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WHBV	Woodchuck Hepatitis B Virus (virus de l'hépatite B de la marmotte)
WMHBV	Wooly Monkey Hepatitis B Virus (virus de l'hépatite B du singe laineux)

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : (A) aborigène australien ; (B) Mise en évidence de l'antigène Australia par immunodiffusion en milieu gélosé	6
Figure 2 : Phylogénie des <i>Hepadnaviridae</i>	8
Figure 3 : Photographie en microscopie électronique des particules virales.....	9
Figure 4 : Structure du VHB.	10
Figure 5 : Organisation du génome du VHB des mammifères.	13
Figure 6 : Structure du signal d'encapsidation	16
Figure 7 : Schéma de la région codant les trois protéines d'enveloppe (L, M, S)	18
Figure 8 : Schéma de la région codant la polymérase du VHB.....	20
Figure 9: Localisations du site d'attachement du VHB à la cellule et du domaine «motif fusion»	23
Figure 10 : Les ARN du VHB (et phases de lecture).	26
Figure 11 : Cycle de réplication du virus de l'hépatite B.....	28
Figure 12 : Répartition géographique des génotypes A à H du VHB.	31
Figure 13 : Principales mutations décrites sur le déterminant «a»de la protéine S.....	33
Figure 14 : Structure du gène codant les protéines HBc et HBe et émergence des mutants précocore.....	35
Figure 15 : Répartition mondiale de la prévalence de l'Hépatite B.	38
Figure 16 : Histoire naturelle de l'infection par le VHB selon les régions d'endémie. ...	43
Figure 17 : Evolution de l'infection par le VHB chez un adulte immunocompétent dans les régions non endémiques.....	51
Figure 18 : Démarche diagnostique de l'infection par le VHB au laboratoire.....	52
Figure 19 : Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite B aiguë.....	56
Figure 20 : Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite B chronique	58
Figure 21: Positions des principales mutations de résistance aux antiviraux.....	70
Figure 22 : Schéma de la région PrÉS/S étudiée.....	92
Figure 23 : Alignement de la séquence en acides aminés de la région PrÉS2 de 33 souches de VHB de la RCA : comparaison avec les souches de référence des génotypes A1, D3, D5 et E (X75657).	105
Figure 24 : Arbre phylogénétique de 56 souches du VHB/E de la RCA construit à partir du gène S: comparaison avec les souches de référence du génotype E.....	107
Figure 25: Arbre phylogénétique de 56 souches du VHB de la RCA construit à partir du gène <i>préC/C</i> : comparaison avec 28 souches de références du génotype E.....	109
Figure 26 : Arbre phylogénétique du génome complet des 30 souches de VHB de la RCA : comparaison avec 31 souches de référence des génotypes A à H.....	111
Figure 27 : Arbre phylogénétique construit à partir du gène S des souches de génotypes A et D de la RCA : comparaison avec les souches de référence des génotypes A, E et D.	113
Figure 27a: Arbre phylogénétique détaillé de la souche RCA 204 construit à partir du gène S : comparaison avec les différents sous-groupes des souches de référence du génotype A.....	114

Figure 27b: Arbre phylogénétique détaillé des souches RCA175 et RCA202 construit à partir du gène <i>S</i> : comparaison avec les différents sous-groupes des souches de référence du génotype D.....	115
Figure 28 : Arbre phylogénétique construit à partir du gène <i>C</i> des souches de génotypes A et D de la RCA : comparaison avec les souches de référence des génotypes A, E et D.	116
Figure 28a : Arbre phylogénétique détaillé des souches RCA175 et RCA177 construit à partir du gène <i>C</i> : comparaison avec les différents sous-groupes des souches de référence du génotype D.....	117
Figure 29: Comparaison des points de similarité (méthode SimPlot) des gènes <i>S</i> , <i>X</i> et <i>préC/C</i> de la souche RCA177 avec les séquences des génotype E et D3.	119
Figure 30 : Répartition des génotypes du VHB en Afrique.	130

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales modes de transmission du virus de l'hépatite B	41
Tableau II : Interprétation des marqueurs sérologiques du VHB.....	55
Tableau III : Marqueurs des infections à VHB au cours d'hépatite aiguë d'évolution favorable.....	56
Tableau IV : Marqueurs des infections chroniques à VHB.....	57
Tableau V : Evolution des marqueurs B et delta au cours des co-infections et des surinfections	77
Tableau VI : Séquences des amorces utilisées pour les PCR nichées et les PCR de séquençage.....	86
Tableau VII : Caractéristiques des patients centrafricains selon leur statut sérologique vis-à-vis du VHB	103
Tableau VIII : Répartition des patients selon l'âge et le sexe	120
Tableau IX : Distribution des patients selon les signes cliniques	121
Tableau X : Répartition des patients selon les caractéristiques de l'hépatomégalie	122
Tableaux XI : Répartition des hépatomégalies selon les types de lésion.....	122
Tableau XII : Répartition des patients selon la sérologie VHB/VHD et les analyses biologiques	125

INTRODUCTION GENERALE

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) constitue un problème de santé publique mondial majeur. D'après les derniers chiffres de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), actuellement 2 milliards d'individus dans le monde ont été infectés par le VHB et environ 350 à 400 millions d'entre eux ont une infection chronique et sont porteurs de l'antigène de surface du VHB (AgHBs), avec un risque élevé d'évolution vers la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC). On estime à plus de 300 000 le nombre de nouveaux cas de CHC observés par an dans le monde. Du fait des complications de l'hépatite chronique et de ses conséquences, un million de personnes décéderont chaque année de cette infection (**WHO, 2002**). Parmi les virus à ADN qui infectent l'homme, le VHB est celui dont le génome est le plus petit. C'est un virus enveloppé à ADN bicaténaire partiel dont le cycle de développement fait intervenir une polymérase virale, qui effectue la synthèse d'ADN génomique à partir d'un ARN pré-génomique (ARN_{pg}). Le génome viral de 3 200 paires de base est caractérisé par un chevauchement des cadres de lecture. Malgré cette importante condensation de l'information 10 à 20% de la séquence de l'ADN viral peut varier sans nuire à la réplication. Les régions les plus susceptibles de variation sont la région Pré-S2 et le gène X. La survenue de mutations permet d'expliquer les variations antigéniques et les variations de séquence du génome ont permis de définir des génotypes. Cette classification repose sur des divergences intergroupes supérieure à 8% de la séquence nucléotidique du génome complet. En général, les génotypes sont déterminés à partir de la région Pré-S2. Actuellement 8 génotypes sont identifiés, classés de A à H (**Okamoto et al., 1987; Norder et al., 1993; Stuyver et al., 2000**) dont la plupart a une distribution

géographique plus ou moins distincte (**Kimbi et al., 2004; Hannoun et al., 2005; Kurbanov et al., 2005; Makuwa et al., 2006; Olinger et al., 2006**).

En Afrique subsaharienne l'infection par le VHB est endémique. La prévalence des anticorps anti-HBV est très élevée et celle des infections chroniques atteint souvent 15 % (**Pawlotsky et al., 1995 ; Kurbanov et al., 2005 ; Makuwa et al., 2006**). Les infections à VHB sont cependant peu étudiées. Cependant, la cartographie des géotypes est de mieux en mieux connue et le géotype E est prédominant dans plusieurs pays du Sénégal à l'Angola.

En République Centrafricaine, peu de travaux ont été réalisés jusqu'à présent malgré une forte prévalence de l'infection. Une étude menée en 1982 sur la détection de l'AgHBs à l'Institut Pasteur de Bangui a mis en évidence une prévalence de l'AgHBs relativement élevée (14%). En 1995, un dépistage réalisé chez les adolescents et jeunes adultes sexuellement actifs reçus en consultation au centre MST/SIDA de Bangui, a montré une prévalence des anticorps anti-HBc de 89% et de l'AgHBs de 15,4% (**Pawlostky et al., 1995**). En 2002 une étude séro-épidémiologique menée chez les femmes enceintes à Bangui, âgées de 15 à 45 ans, a montré une prévalence de l'AgHBs de 12,1%.

Aussi dans la première partie de notre travail nous avons étudié la répartition des géotypes du VHB chez les patients atteints d'hépatite chronique hospitalisés dans le service d'Hépatogastro-Entérologie de l'hôpital de l'Amitié à Bangui. Ce travail a été mené en collaboration avec le laboratoire de Virologie du CHU de Nancy et le Département d'Immunologie du Laboratoire National de la Santé du Luxembourg.

L'objectif principal était de caractériser les souches de VHB présentes chez les patients atteints d'hépatite chronique en effectuant leur géotypage.

Les objectifs secondaires étaient de réaliser une analyse phylogénétique de ces virus, et de faire une comparaison avec les résultats déjà obtenus dans les autres pays africains et de rechercher d'éventuels virus présentant des recombinaisons entre différents génotypes du VHB.

La deuxième partie du travail a été menée dans le service d'Hépatogastro-Entérologie de l'Hôpital de l'Amitié. En RCA, le cancer primitif du foie est une affection fréquente avec en moyenne 2 ou 3 cas de CHC par semaine. Ces chiffres, très certainement sous-estimés, ne donnent qu'une image partielle de la fréquence réelle des CHC étant donné le faible taux de fréquentation des hôpitaux et une politique vaccinale inexistante dans ce pays. Une étude clinique et biologique a été menée sur 68 patients admis dans le service pour une suspicion de carcinome hépatocellulaire (CHC). Ce travail a mis à contribution les services d'Hépatogastro-Entérologie, de Radiologie et d'Imagerie Médicale de l'hôpital de l'Amitié ainsi que le Laboratoire National de Biologie Clinique et de Santé Publique de Bangui.

L'objectif principal était de décrire chez les patients atteints, les tableaux cliniques et biologiques du CHC. L'objectif secondaire est d'utiliser la banque de sérum et de prélèvements de lésions de CHC par cytoponction que nous avons constituée pour étudier, par la suite, la variabilité du gène X des VHB isolés chez ces patients (**Venard et al., 2000**). Il nous sera possible de comparer les souches circulantes et celles présentes *in situ* et de déterminer s'il existe des différences selon qu'ils sont atteints d'hépatite chronique (sans tumeur) ou de CHC. Une intégration du génome viral dans celui des hépatocytes tumoraux pourra également être étudiée.

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. HISTORIQUE

On distingue deux catégories d'hépatites : les hépatites dites « post-transfusionnelles » ou « sériques » (hépatites B, C et D), transmises par le sang, les produits biologiques ou les sécrétions et les hépatites épidémiques (hépatites A et E) de transmission oro-fécale.

Les hépatites ont été décrites dès le moyen âge et son importance était liée aux mauvaises conditions d'hygiène dans lesquelles vivait la population. Le principal signe clinique est l'apparition d'un ictère (jaunisse). Il est associé à une décoloration des selles et des urines foncées, guérissant en quelques semaines.

En 1940, la découverte des groupes sanguins a permis la mise en œuvre des transfusions sanguines. Des ictères ont alors été observés chez les sujets transfusés. Des hépatites ont également été diagnostiquées chez des sujets vaccinés contre la fièvre jaune car, le vaccin contenait du sérum humain.

En 1956, Le Professeur Saul Krugman, par l'observation d'enfants handicapés hospitalisés pour ictère, suspecte la présence de deux agents infectieux différents, vraisemblablement des virus, responsables d'hépatites : l'un responsable d'une hépatite à incubation courte, transmissible par voie oro-fécale; l'autre associé à une hépatite à incubation longue, transmissible par voie parentérale. Le premier virus est appelé virus de l'hépatite A; et le second, virus de l'hépatite B.

1.1.1. Découverte du virus de l'hépatite B

C'est en 1964 que Baruch S. Blumberg et son équipe mirent en évidence, dans le sang d'un aborigène australien atteint d'hépatite, un nouvel antigène qui réagissait spécifiquement avec des sérums de patients hémophiles américains polytransfusés,

(Blumberg et al., 1965). Cet antigène nommé antigène Australia, sera ultérieurement associé de façon spécifique à une hépatite post-transfusionnelle dite hépatite B en 1967-1968 (Prince, 1968).

Il faudra cependant attendre 1970 pour que Dane et ses collaborateurs, grâce à la microscopie électronique, identifient des particules dans le sérum de trois malades atteints d'hépatite (particules de Dane), agglutinables par des anticorps spécifiques de l'antigène Australia (Dane et al., 1970). L'antigène Australia sera ensuite identifié comme étant la protéine de surface du virus de l'hépatite B, désigné sous le sigle AgHBs.

En 1975, l'équipe de P. Maupas, de Tours, publie les premiers résultats d'une vaccination contre le VHB utilisant comme source vaccinale l'antigène Australia purifié à partir de plasma de porteurs chroniques (Maupas et al., 1976).

En 1986, le premier vaccin mondial obtenu par génie génétique et commercialisé est le vaccin contre l'hépatite B.

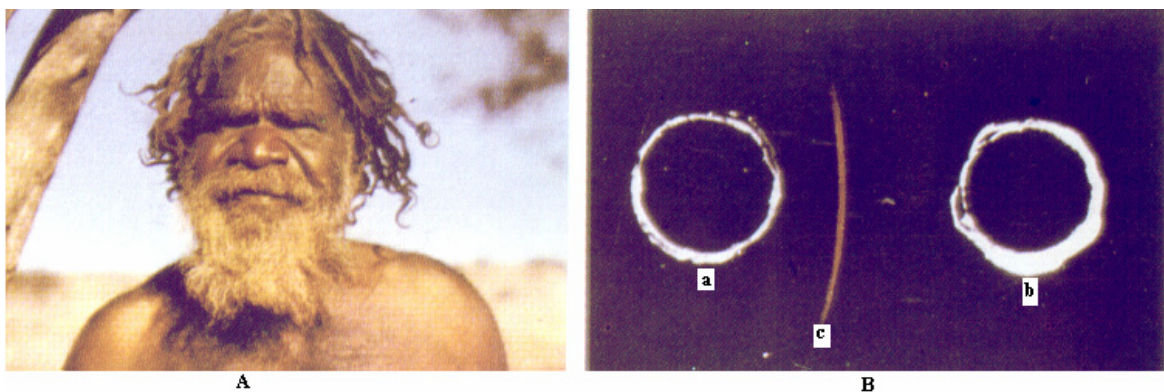


Figure 1 : (A) aborigène australien ; (B) Mise en évidence de l'antigène Australia par immunodiffusion en milieu gélosé

Puits a : antigène Australia ; puits b : anticorps spécifique. Après diffusion, la rencontre de l'Ag et de l'Ac dans la zone d'équivalence, entraîne la formation d'un arc de précipitation (c). (D'après Doerr HW and Gerlich WH, In: Medizinische Virologie. Verlag, 2002).

1.2. LES *HEPADNAVIRIDAE*

1.2.1. Taxonomie

La présence du VHB chez un petit nombre d'espèces rend difficile toute étude phylogénétique des *Hepadnaviridae*. En effet, à la différence des rétrovirus, présents chez toutes les espèces des oiseaux à l'homme, le VHB n'a été décrit que chez un petit nombre d'oiseaux, quelques rongeurs, certains primates et l'homme (Figure 5). La famille des *Hepadnaviridae* rassemble les virus de l'hépatite B dont l'espèce type est le virus humain (Virus de l'hépatite B ou VHB ; Hepatitis B virus ou HBV). Cette famille comprend deux genres : *Orthohepadnavirus* et *Avihepadnavirus*.

– Le genre *Orthohepadnavirus* comprend le virus de l'hépatite B humaine, ainsi que les virus des rongeurs ; Woodchuck hepatitis B virus ou WHBV chez la marmotte (**Summers et al., 1978**), Ground Squirrel hepatitis B virus ou GSHBV chez les tamias ou l'écureuil fouisseur (**Marion et al., 1980**). Bien que leurs génomes soient proches de celui du VHB, ils ne sont pas connus pour infecter l'homme ou le singe. Des virus de l'hépatite B ont été identifiés chez les grands primates (Chimpanzé : ChHBV (**Hu et al., 2000**), Gorille : GoHBV, Orang-outang : OuHBV, Gibbon : GiHBV) et le singe laineux (Woolly Monkey : WMHBV). Pour le moment les différences entre ces virus et le virus humain ne permettent pas de les classer dans des espèces séparées.

– Le genre *Avihepadnavirus* rassemble les virus de l'hépatite B du canard de Pékin (Duck Hepatitis B virus, DHBV) (**Mason et al., 1980**), du héron (Heron Hepatitis B virus, HHBV) (**Sprengel et al., 1988**), et de l'oie blanche des neiges (Snow Goose Hepatitis B virus, SGHBV) (**Chang et al., 1999**). Ils sont rarement responsables de

manifestations cliniques et leur transmission est surtout verticale. Ils diffèrent des virus de mammifères par l'absence de gène X.

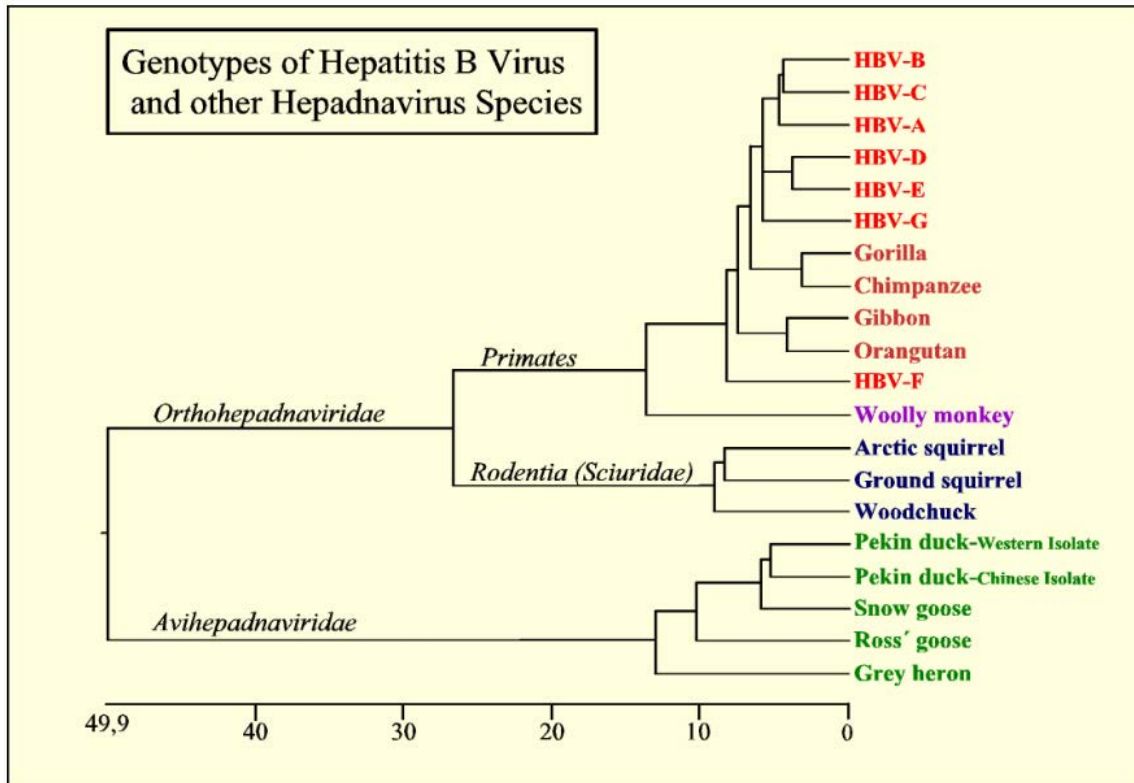


Figure 2 : Phylogénie des *Hepadnaviridae*.
(D'après Doerr HW and Gerlich WH, In: Medizinische Virologie Verlag, 2002).

1.2.2. Particules du VHB : formes circulantes

Le virus de l'hépatite B est de culture difficile mais il a été mis en évidence très tôt par microscopie électronique grâce à la forte concentration de particules virales dans le sérum des malades. Trois types de structure peuvent être observées (**Dane et al., 1970; Tiollais et al., 1985**) (Figure 6).

- Les particules virales infectieuses de 40 à 48 nm de diamètre, appelées particules de Dane correspondant aux virions complets. Elles sont les moins fréquentes et

sont constituées d'un core (nucléocapside contenant un ADN partiellement bicaténaire associé à une ADN polymérase) et d'une enveloppe.

– Les particules sphériques ou sphérules, très nombreuses, de 18 à 25 nm de diamètre et des filaments ou tubules de 22 nm de diamètre sur 50 à 250 nm de longueur qui pourraient être des sphères agrégées. Ces deux derniers éléments ont la même structure que l'enveloppe virale et portent l'AgHBs. Ils se composent d'une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique et ont un diamètre de 25 à 27 nm. Ces sphérules et filaments, non infectieux, sont produits en excès. Il peut y avoir en moyenne $3 \cdot 10^{13}$ sphères pour $2 \cdot 10^{12}$ filaments et $2 \cdot 10^{10}$ particules de Dane dans 1 mL de sérum d'un sujet infecté.

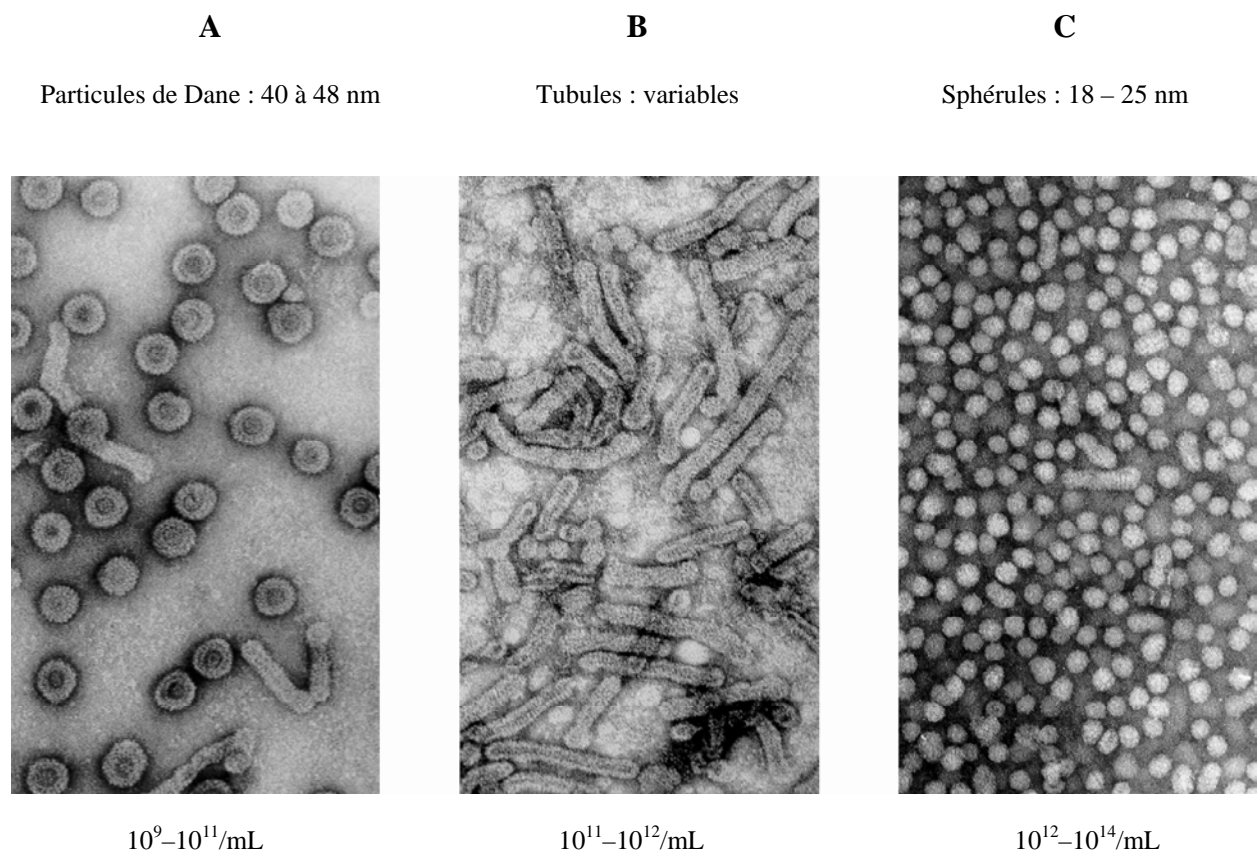


Figure 3 : Photographie en microscopie électronique des particules virales.

Dans le sérum d'un patient chroniquement infecté, on distingue les trois formes de particules : virion complet ou particules de Dane (A) infectieux, filaments ou tubules (B) et sphères ou sphérules (C), non infectieux et constitués seulement d'antigène de surface (AgHBs). (D'après Doerr HW and Gerlich WH, In: Medizinische Virologie Verlag, 2002).

1.2.3. Structure du virion

Le virion, ou particule de Dane, est un virus enveloppé possédant une capsidie icosaédrique formée d'un seul type de protéine (protéine C, correspondant à l'antigène HBc) qui renferme une molécule d'ADN circulaire, partiellement double brin avec un brin complet de polarité négative (-) et un brin de polarité positive (+) qui ne représente que 50 à 80% du génome (Figure 7). L'ADN est associé à la polymérase virale et à une protéine terminale attachée au brin long. La nucléocapsidie est entourée d'une enveloppe lipidique qui dérive du réticulum endoplasmique (RE) et qui porte trois glycoprotéines de tailles différentes (L ou Large, M ou Medium et S ou small) ayant toutes la même spécificité antigénique HBs.

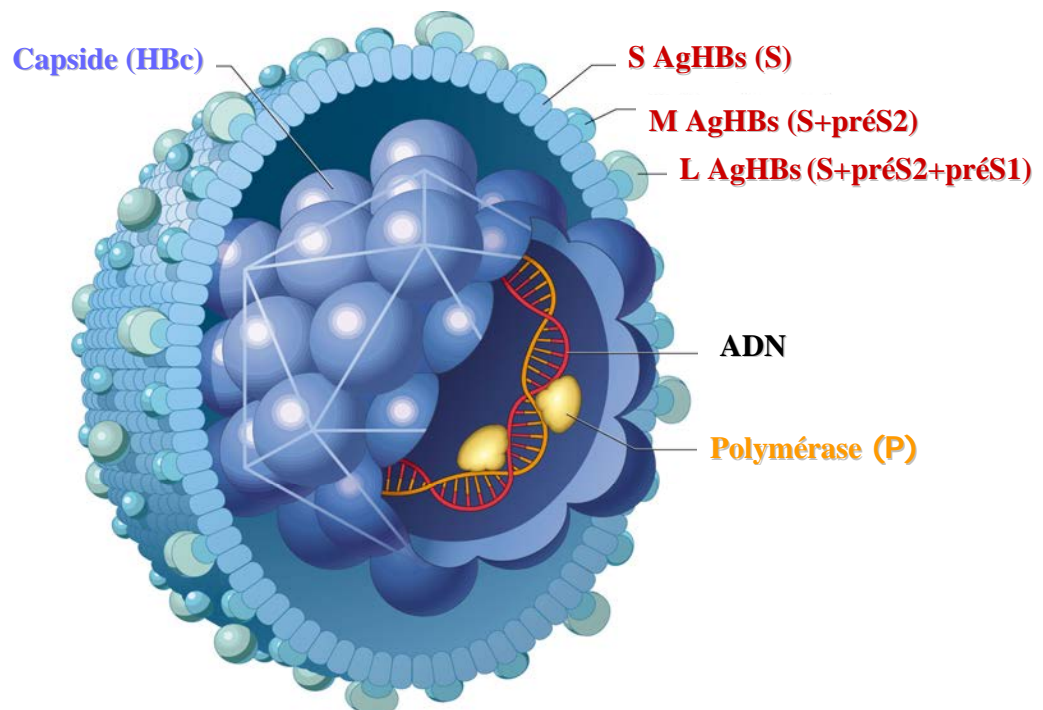


Figure 4 : Structure du VHB.

L'enveloppe est constituée par des sous-unités protéiques codées par les gènes S, préS1 et préS2. La capsidie est formée par l'union de plusieurs sous-unités HBc. Elle contient l'ADN du virus et les enzymes impliquées dans la répllication. <http://www.molecular-virology.uni-hd.de>

1.2.4. Propriétés physico-chimiques

Bien qu'il soit enveloppé, le VHB est relativement résistant. En effet, à l'extérieur de l'hôte, le VHB survit dans le sang pendant plusieurs semaines. Il est le seul virus enveloppé capable de résister pendant 7 jours à 25°C dans l'environnement (sur les surfaces). L'infectivité d'un sérum contagieux est stable à 37°C pendant 60 minutes (min) et persiste pendant des années à -70°C. Le VHB est sensible à l'hypochlorite de sodium à 5%, à l'éthanol à 70%, au glutaraldéhyde à 2%, et au formaldéhyde. L'infectivité est cependant détruite après quelques minutes à 100°C.

1.2.5. Le génome du VHB

Les *Hepadnaviridae* possèdent un ADN de petite taille (3200 pb) et leur génome est le plus petit parmi les virus à ADN. Il a été séquencé dès 1979 (**Galibert et al., 1979**; **Pasek et al., 1979**). La numérotation des bases du génome est faite à partir du site unique de restriction par l'enzyme *Eco* RI pris comme origine dans le sens des aiguilles d'une montre. Elle utilise comme référence une séquence type du VHB sauvage.

– Dans le virion, le génome est sous la forme d'un ADN partiellement double brin, fermé de façon non covalente. Le brin long de polarité négative (-), dont la séquence est complémentaire de celle des ARN viraux, est complet. Il a une extrémité 3' libre tandis que l'extrémité 5' est liée de façon covalente à la protéine terminale (Terminal protein : TP) codée par l'ADN viral. Le brin court de polarité positive (+) a une extrémité 5' fixe, complémentaire des 224 premières bases du brin (-) qui assure la circularité de l'ADN viral. La longueur de ce brin (+) est variable et représente 50 à 80% de celle du brin (-).

– Dans le noyau de l'hépatocyte, l'ADN viral est sous forme d'une molécule circulaire, fermée de façon covalente et super-enroulé (ccc DNA : covalently closed circular DNA ou ADNccc). Certains auteurs le comparent à un mini chromosome. Il sert de matrice pour la synthèse des ARN messagers (ARNm) viraux. L'ADNccc est extrêmement stable et persiste sous forme épisomique au sein des hépatocytes et probablement d'autres cellules permissives. Il est à l'origine du portage chronique et des phénomènes de réactivation.

1.2.5.1. Organisation du génome

– Cadres de lecture

L'organisation du génome du VHB est extrêmement compacte, plus de la moitié étant lue sur plusieurs cadres de lecture. Quatre cadres ouverts de lecture (ORF : Open Reading Frame) chevauchants, dans la même orientation transcriptionnelle, ont été identifiés et codent neuf protéines (Figure 5) :

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

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

– Le gène *P* qui fait 80% du génome, code trois peptides avec successivement la protéine terminale, une région non codante («spacer ou espaceur»), la polymérase proprement dite qui a une activité ADN polymérase ARN dépendante et ADN dépendante (transcriptase inverse) et la RNase H. Le clivage des peptides viraux est assuré par des enzymes cellulaires. Bien que possédant une transcriptase inverse proche de celle des rétrovirus, le génome du VHB ne code pas de protéase.

– Le gène *X*, code une protéine régulatrice HBx, qui du fait de son activité transactivatrice pourrait être impliquée dans la cancérogenèse induite par le VHB. Il n'existe pas de cadre ouvert de lecture correspondant à la région X chez DHBV. Le CHC est directement lié à l'infection par le VHB. Les mécanismes de carcinogénèse qui peuvent expliquer sa survenue chez un patient infecté sont multiples. Cependant le rôle d'une protéine X mutée qui aurait acquis des fonctions altérées par mutation est suspecté, au moins dans certains cas, bien qu'un tel mécanisme reste à prouver.

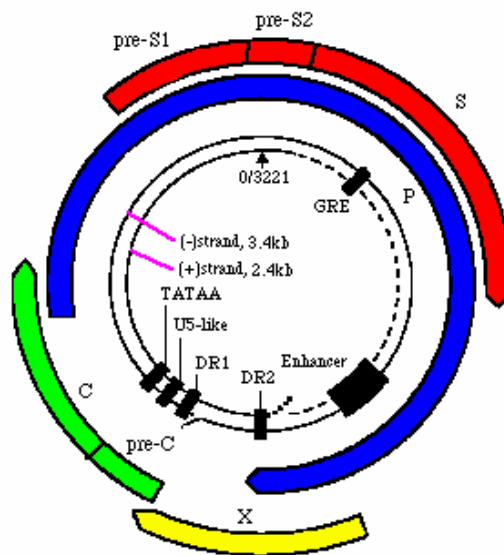


Figure 5 : Organisation du génome du VHB des mammifères.

L'ADN est circulaire (en noir), partiellement double brin, avec le nucléotide 1 correspondant au site de restriction EcoRI. Il contient quatre promoteurs et des séquences de régulation (signal de polyadénylation, enhancer) qui commandent la synthèse de quatre transcrits codant la capsid virale (C : core, préC : précore), la polymérase (P), l'enveloppe (préS1, préS2, S) et la protéine transactivatrice (X), dont les cadres de lecture sont représentés à la partie externe de la figure. (D'après Seeger C and Mason WS, In: Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000).

– Séquences régulatrices et éléments structuraux

Le génome du VHB possède des séquences de régulation qui activent la lecture des gènes viraux et des éléments structuraux qui vont définir la structure des ARN et ADN et qui sont essentiels pour la réplication virale :

Séquences régulatrices

Le VHB possède deux éléments activateurs de la transcription : “enhancers” (Enh) I (en amont du gène X) et II (en amont du promoteur basal du core et du cadre de lecture C) qui agissent sur tous les promoteurs viraux et commandent la synthèse des quatre transcrits codant la protéine de la capsid virale, la polymérase, les protéines d’enveloppe et la protéine transactivatrice.

Deux autres éléments influencent la transcription virale. D’abord, un élément répondant aux glucocorticoïdes (glucocorticoïde Responsive Element ou GRE) qui se situe dans le gène S, permet un accroissement de l’expression des gènes de cinq fois en présence de glucocorticoïde. En effet, chez des patients prenant des glucocorticoïdes, on observe souvent une augmentation de la transcription et exacerbation de la virémie.

Le second est l’élément de régulation post-transcriptionnelle (ERP), un grand élément qui chevauche complètement le promoteur X, partiellement l’EnhI et le début du gène X. L’ERP (probablement aidé par des facteurs cellulaires) permet l’exportation efficace des ARN non épissés du VHB vers le cytoplasme.

Eléments structuraux

Ces éléments comprennent un signal d’encapsidation, deux séquences répétées directes DR1 et DR2 (Direct repeat) et un signal de polyadénylation. Ce n’est pas seulement les séquences de ces éléments qui sont importantes mais également les

positions qu'ils occupent sur le génome. A l'exception de la DR2, tous ces éléments se situent sur une courte région du génome de moins de 100 nucléotides (nt).

Le signal d'encapsidation (Figure 6) permet l'encapsidation simultanée de l'ARNpg et de la polymérase. Il est l'équivalent d'épsilon chez les rétrovirus, mais chez les hépadnavirus le signal d'encapsidation est étroitement lié à l'initiation de la synthèse de l'ADN (-). C'est une région hautement conservée des génomes des *Hepadnaviridae*. Il est constitué de deux tiges-boucles superposées, la séquence de la tige-boucle supérieure n'étant pas primordiale mais les séquences de la tige et de la boucle inférieure sont importantes. La plus part de séquences du signal sont comprises dans la région C, mais le codon d'initiation de l'AgHBc est également présent dans la structure.

La DR1, de 11 nt chez le VHB et 12 chez le DHBV, est située immédiatement en 5' du signal d'encapsidation. Les DR1 et DR2 vont définir les extrémités 5' de l'ADN (-) et du brin (+) respectivement, et la distance entre les deux (environ 200 nt) va déterminer la longueur des extrémités cohésives qui vont maintenir la circularité du génome. Chez le VHB, la DR2 est environ 220 nt en amont de la DR1 mais chez le DHBV DR2 et DR1 ne sont séparées que d'une trentaine de nucléotides.

Les hépadnavirus des mammifères n'ont qu'un signal de polyadénylation (TATAAA), donc tous les transcrits viraux sont polyadénylés au même endroit. Le signal de polyadénylation se trouve immédiatement en 3' du signal d'encapsidation, au début de la région codante de l'AgHBc. Les hépadnavirus aviaires utilisent le signal de polyadénylation AATAAA.

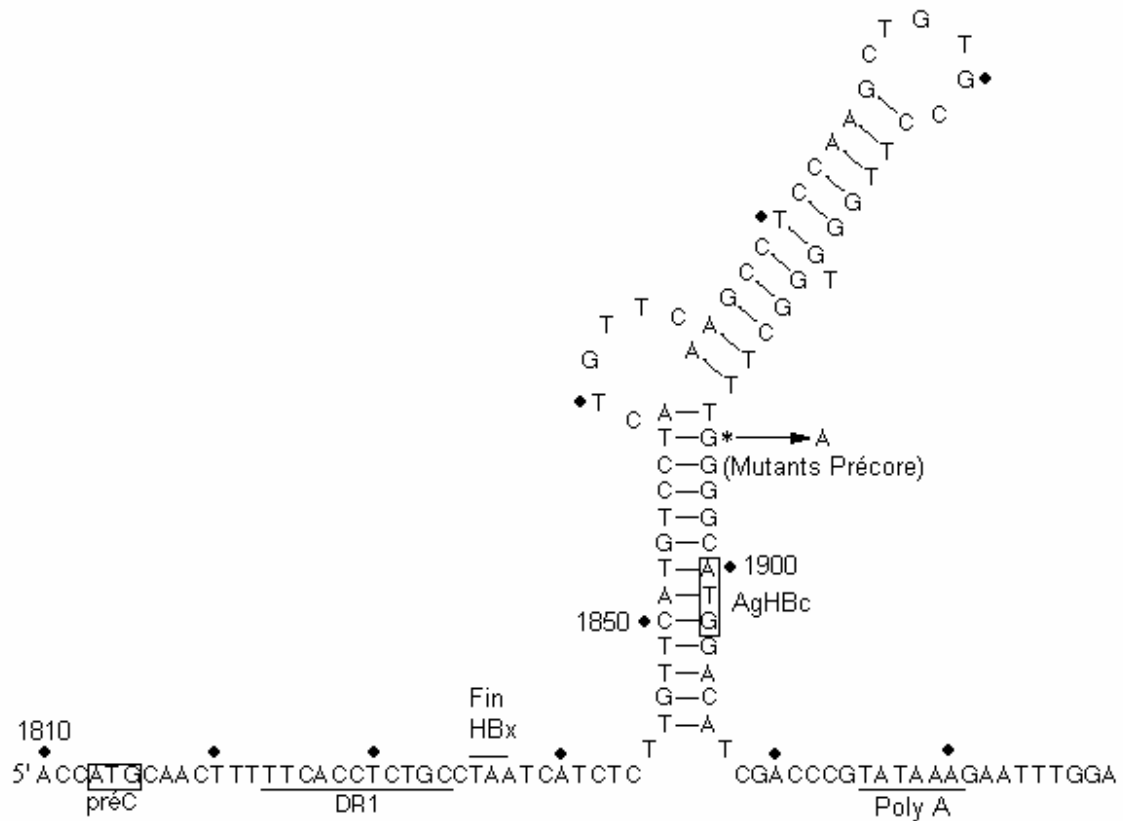


Figure 6 : Structure du signal d'encapsidation

(D'après Kay A. dans: Hépatites B et C; Virologie, John Libbey Eurotext, Ed 2006).

1.2.6. Les protéines virales

1.2.6.1. Protéines de surface (ou d'enveloppe)

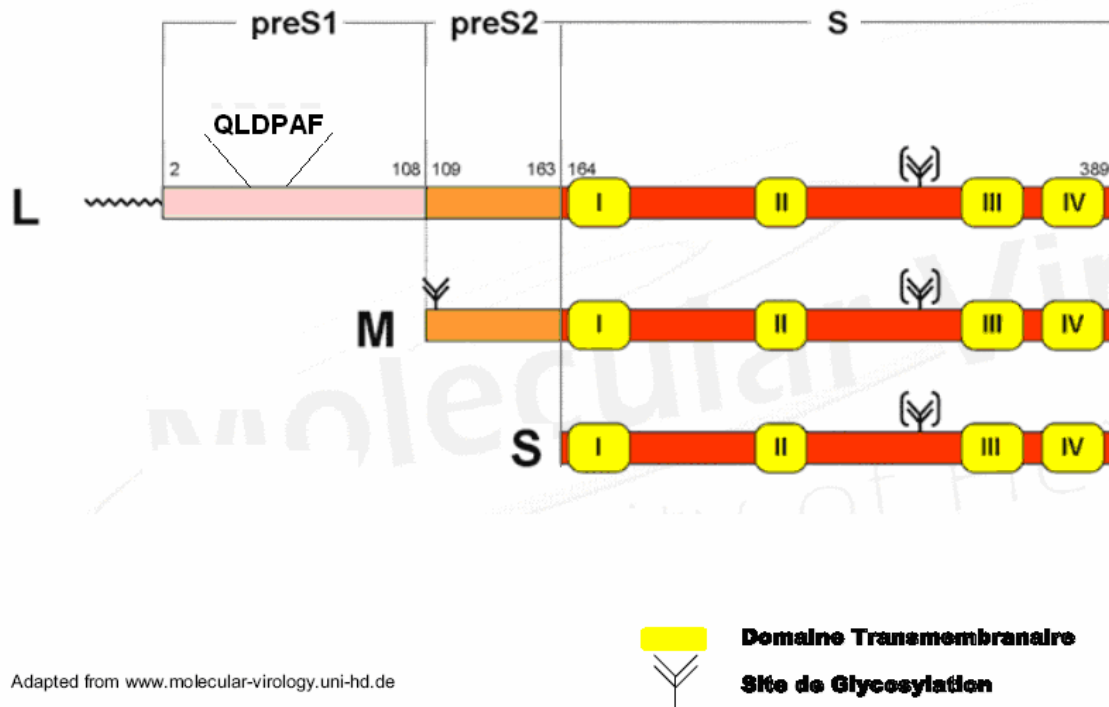
Un seul cadre ouvert de lecture (région PréS/S) code les trois protéines de surface de tailles différentes mais qui ont la même extrémité carboxyle. Il contient trois codons d'initiation en phase qui divisent cette séquence codante en trois régions : Pré-S1, Pré-S2 et S. Les trois protéines synthétisées sont partiellement glycosylées dans la cellule et existent sous deux formes et six protéines différentes sont ainsi produites :

– La protéine S (226 acides aminés (aa) ; non glycosylée : p24 ; forme glycosylée : gp28)) est la plus petite des trois protéines. Elle est traduite à partir du troisième codon d'initiation. Elle est le composant majeur de l'enveloppe virale et également des vaccins anti-VHB. En effet, la plus part des anticorps neutralisants ciblent une partie de l'AgHBs qui est exposé à la surface des particules virales. C'est donc une protéine membranaire, et le modèle couramment admis est qu'elle possède quatre régions hydrophobes et transmembranaires (TM) avec une large région centrale et hydrophile (Boucle ou Région Hydrophile Majeure, RMH) exposée à la surface de la particule virale (Figure 7)

– Avec 55 aa supplémentaires, la protéine M (281 aa ; non glycosylée : p24 – p31; glycosylée : gp 33 – gp 36) est traduite à partir du second AUG. Elle possède les mêmes séquences et la même topologie membranaire que la protéine S. Elle ne semble pas être essentielle pour la morphogenèse des particules infectieuses.

– La protéine L (329 aa ; non glycosylée : p39 ; glycosylée : gp42), traduite à partir d'un ARNm différent des deux autres protéines, résulte de la traduction de toute la phase ouverte de lecture. Elle représente environ 10 à 20 % des protéines d'enveloppe dans les filaments et dans les virions respectivement, contre seulement 1 % dans les sphères. La protéine L peut adopter deux topologies membranaires. Initialement, les régions PréS1, PréS2 et la région TM1 de l'AgHBs sont retenues du côté cytoplasmique où elles participent à l'enveloppement de la nucléocapside. Pendant le transport du virion vers la surface cellulaire, au moins une partie des molécules de PréS1 change de conformation avec insertion de la région TM1 dans la membrane et externalisation des régions PréS1 et PréS2. Ceci doit se produire après le passage dans le RE, seul endroit où la glycosylation peut avoir lieu. Ce changement de topologie est nécessaire car les séquences proches de l'extrémité N-terminale de la protéine PréS1 (séquence QLDPAF)

(Figure 7) jouent un rôle déterminant dans la reconnaissance des hépatocytes par le virion (Lu et al., 2004). Ceci confère l'infectivité à la particule virale. La protéine L est donc essentielle pour la maturation virale.



Adapted from www.molecular-virology.uni-hd.de

Figure 7 : Schéma de la région codant les trois protéines d'enveloppe (L, M, S)

Les quatre domaines transmembranaires et les sites de glycosylation et de reconnaissance des hépatocytes sont représentés (Adapté de : <http://www.molecular-virologie.uni.de>)

Les protéines S, M et L ont toutes la même spécificité antigénique HBs. Celle-ci est portée par une séquence hydrophile correspondant aux acides aminés 121 à 150 de la protéine S.

1.2.6.2. Protéine de la capsid et la protéine Précore

De même dans l'ORF C, deux codons initiateurs en phase servent à la traduction de la protéine de capsid (Protéine core ou AgHBc) et d'une protéine soluble (protéine précore ou protéine E ou AgHBe).

- Protéine de la capsid

La protéine core est le constituant majeur de la capsid, mais il n'est pas recherché en pratique chez les patients. C'est une protéine phosphorylée de 22 kDa (183 à 185 aa) produite par translation de l'initiation au 2^{ème} AUG de *préC/C*. Elle est constituée, dans sa région N-terminale, d'un domaine important pour l'auto-assemblage et, à l'extrémité C-terminale, d'un domaine riche en arginines indispensable pour l'encapsidation de l'ARN.

- Protéine Précore

La protéine précore (212 aa ; 25 kDa) est le précurseur de l'AgHBc. Elle est synthétisée à partir du premier codon ATG du cadre C. Elle diffère de la protéine de capsid par la présence d'une région N-terminale de 29 aa. Cette région est hydrophobe et forme un peptide signal qui dirige la protéine naissante vers le RE. Cette protéine transite par l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire et, pendant le transport, le peptide signal (séquence de 19 aa) et la queue basique sont éliminés. La protéine maturée (AgHBe de 15 à 18 kDa) est sécrétée sous forme soluble dans le sérum des patients infectés et sa présence est le témoin d'une répllication virale.

1.2.6.3. Polymérase

Le gène *P* qui correspond à 80% du génome code la polymérase virale (832 à 845 aa selon le génotype du VHB; 92 kDa) qui est composée de trois domaines (Figure 8) fonctionnels correspondant de 5' en 3' respectivement à :

- La protéine terminale (Terminal protein) qui se lie à l'extrémité 5' du brin (-) d'ADN dans la particule virale et sert également d'amorce à l'initiation de sa synthèse (*primase*).

- Une région intermédiaire ou espaceur (*spacer*) qui ne correspond à aucun

peptide mais dont la taille et le repliement permettent une interaction des différents domaines avec le génome viral. Elle est également indispensable pour assurer l'encapsidation de l'acide nucléique.

- L'ADN polymérase qui est une transcriptase inverse et qui assure la synthèse de l'ADN génomique puis, celle du 2^{ème} brin d'ADN complémentaire à partir de l'ARN pré-génomique. Ce domaine contient au site actif le motif peptidique YMDD qui est également présent dans la transcriptase inverse du VIH.

- La RNase H qui dégrade l'ARN complémentaire du brin d'ADN (+) néoformé.

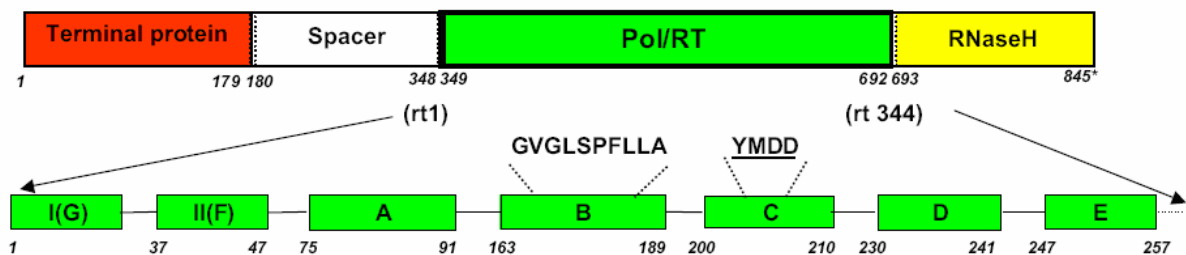


Figure 8 : Schéma de la région codant la polymérase du VHB.

Les quatre régions (protéine terminale, espaceur, transcriptase inverse et RNase H) de la polymérase sont indiquées. La transcriptase inverse comporte différents domaines (A-G) impliqués dans l'activité enzymatique. On trouve dans le domaine catalytique C, le motif YMDD (souligné) commun au VIH et dont la mutation confère la résistance à la lamivudine (D'après Gordien E : Cours Virus de l'hépatite B ; Actualités virologiques, Institut Pasteur, Paris. Mai 2006).

1.2.6.4. Protéine X

La protéine X ou HBx (154aa ; 17 kDa), porte la spécificité antigénique HBx. Sa structure est conservée parmi les souches du VHB malgré de grandes variations de séquences. Elle possède une activité protéine kinase (Sérine et Thréonine kinase) et assurerait sa propre phosphorylation. Elle possède également une activité transactivatrice pour la transcription de certains gènes viraux et des gènes cellulaires. Elle pourrait avoir un rôle dans la carcinogénèse.

1.2.7. La multiplication du virus

1.2.7.1. Culture *in vitro* et modèles animaux

L'absence de lignée cellulaire continue infectable par le VHB a longtemps rendu difficile l'étude approfondie du cycle viral et notamment de ses premières étapes conduisant le génome viral au noyau de la cellule hôte. Seules étaient disponibles des hépatocytes de primo-explantation et des lignées dérivées de CHC permissives pour le VHB (cellules HepG2). Cependant ces dernières nécessitent la transfection par un plasmide exprimant le génome viral ou une micro-injection, pour qu'une réplication virale soit observée. Aussi a-t-on eu recours aux hépadnavirus animaux proches des virus humains. Les deux modèles animaux les plus couramment utilisés sont le canard et la marmotte. Les hépatocytes primaires de canard sont cultivables et infectables par le DHBV, ce qui a permis d'étudier les mécanismes de pénétration du virus. Toutefois, le DHBV étant le plus éloigné phylogénétiquement du virus humain, les résultats issus de son analyse ne sont pas systématiquement applicables aux virus des mammifères. Une nouvelle lignée d'hépatome humain appelée HepaRG a été décrite en 2002 comme susceptible d'être infectée par le VHB (**Gripon et al., 2002**). Ces cellules HepaRG peuvent à confluence se différencier et exprimer des fonctions d'hépatocytes adultes qui restent relativement stables pendant plusieurs jours, voire quelques semaines.

1.2.7.2. Tropisme cellulaire

Le VHB a un tropisme essentiellement hépatocytaire et les formes répliquatives sont essentiellement retrouvées dans les hépatocytes. Cependant, le virus peut également se

multiplier dans les cellules de la lignée sanguine. Les lymphocytes B ont un récepteur pour le virus. L'existence d'une multiplication dans d'autres organes n'est par certaine. Au cours d'infections aiguës l'ADN et l'ARN viral peuvent être détectés dans de nombreux types cellulaires tel que les cellules de la moelle osseuse, les monocytes, les lymphocytes B, les lymphocytes T CD4+ et CD8+, dans le pancréas, les reins et la peau (**Dejean et al., 1984**) et des symptômes extrahépatiques peuvent alors être observés au cours d'infection par VHB (pancréatites, glomérulonéphrites, neuropathies, anomalies du sperme). Par contre, au cours des infections chroniques, le virus est présent presque exclusivement dans le foie. Les cellules lymphocytaires peuvent servir de réservoir pour le virus ce qui peut poser des problèmes lors de transplantation hépatique (infection du greffon) ou de traitement antiviral (reprise de la réplication en fin de traitement).

1.2.7.3. Cycle viral

– Entrée du virus

Attachement

Les évènements précoces du cycle viral (fixation et pénétration du virion dans la cellule) sont encore mal connus. Cependant, les études avec des explants d'hépatocytes humain ou de canard, ont suggéré que le domaine L de la protéine d'enveloppe est impliqué dans l'attachement du VHB à la cellule hôte (**Pontisso et al., 1989; Glebe et al., 2003**). Le site permettant cet attachement a été identifié : c'est la séquence QLDPAF (Figure 9) encadrés par les acides aminés 21 à 47 de la région Pré-S1 (**Paran et al., 2001**) de la grande protéine d'enveloppe.

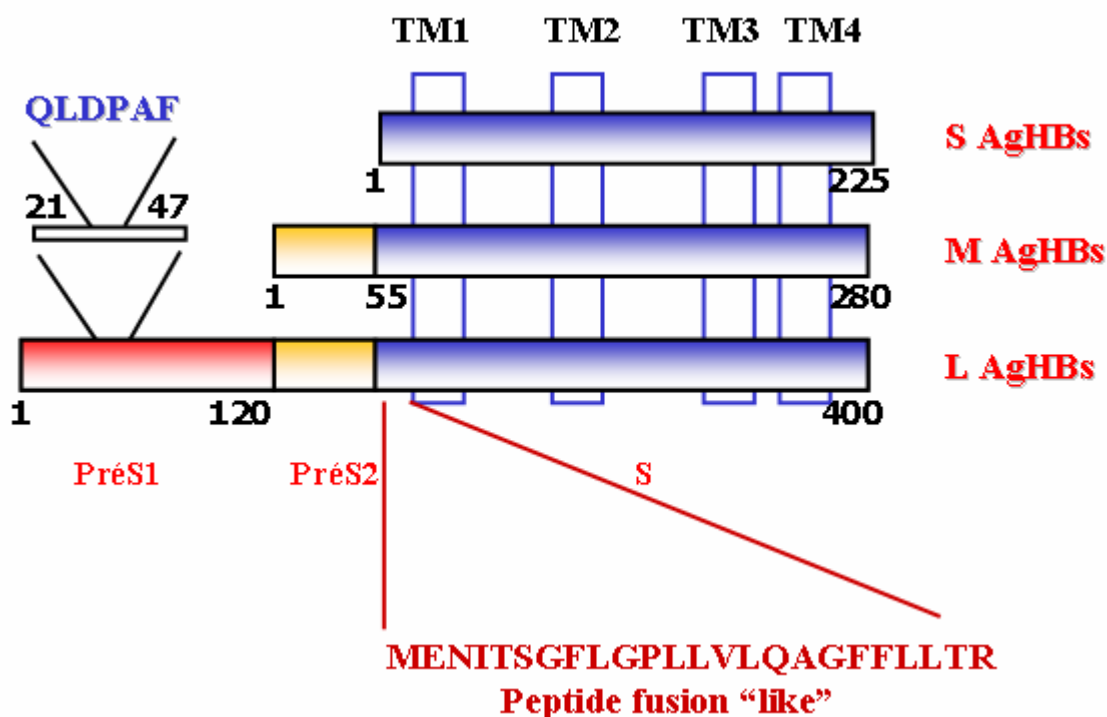


Figure 9: Localisations du site d'attachement du VHB à la cellule et du domaine «motif fusion» (D'après Lu X et al., 2004); TM correspond aux domaines transmembranaires des différentes protéines d'enveloppe.

Récepteur du VHB

A l'heure actuelle, la nature du récepteur hépatocytaire demeure inconnue. Dans le modèle d'infection à DHBV, la molécule permettant l'attachement du virus est la carboxypeptidase D ou gp 180 (Kuroki et al., 1994; Kuroki et al., 1995; Tong et al., 1999). La forme membranaire de cette protéine lie les particules virales avec une grande affinité. Des lignées hépatocytaires hétérologues et non permissives à l'infection par le DHBV, peuvent fixer les particules virales et les internaliser lorsqu'elles expriment la gp 180 (Breiner et al., 1998). Pourtant il reste des points obscurs : les marqueurs classiques d'infection n'ont pas été détectés dans de telles lignées et l'expression ubiquitaire de la gp 180 ne rend pas compte de l'infection naturelle restreinte aux hépatocytes. Par conséquent, la protéine gp 180 est probablement un élément important de l'entrée virale, mais d'autres facteurs et mécanismes restent à découvrir.

Fusion

La pénétration de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de l'hépatocyte fait intervenir un phénomène de fusion. Celle-ci pourrait être liée à un, « fusion motif » ou « peptide fusion like » (Figure 10) composé d'une série d'acides aminés hydrophobes (**Gerlich et al., 1993; Hughson, 1995; Lu X et al., 2004**) appartenant à la protéine S.

– Migration vers le noyau et décapsidation

Lors de son entrée dans la cellule le virus perd son enveloppe. La nucléocapside migre vers le noyau de l'hépatocyte et doit être désassemblée pour y libérer son ADN. Ces mécanismes commencent à être élucidés (**Kann et al., 1997**). Le génome viral qui est encore partiellement double brin pénètre dans le noyau. Le brin positif de longueur variable est complété ce qui donne naissance à une nouvelle forme appelée ADNccc, ou ADN circulaire covalentement clos (**Weiser et al. 1983**). Cette étape de conversion suppose qu'au niveau du brin (+), le « gap » soit comblé, que l'amorce d'ARN soit convertie en ADN correspondant et qu'au niveau du brin (-), la protéine terminale et la redondance terminale DR1 soient éliminées puis le génome doit être ligaturé et superenroulé. Les mécanismes mis en jeu sont encore mal connus et font appel à des enzymes cellulaires. Cet ADNccc, que certains auteurs qualifient de mini-chromosome, peut alors servir de support à la transcription des ARNm viraux.

– Synthèse des ARNm

Les différents ARN viraux sont produits par l'ARN polymérase II de l'hôte. Quatre transcrits différents ont été identifiés : trois ARN messagers (ARNm) et un ARN pré-génomique (pg) tous non épissés. Leur transcription commence à des sites différents mais ils possèdent tous le même site de terminaison en amont d'un signal de polyadénylation (TATAAA) à l'extrémité 3' (Figure 10). Les transcrits de 3,5 et 2,1 kilobases (kb) sont plus abondants dans les cellules infectées et ceux de 2,4 et 0,8 kb sont mineurs.

– Le transcrit de 3,5 kb est traduit en 3 protéines E, C et P selon le site d'initiation de la lecture (**Nassal et al. 1990**). Cet ARN joue également le rôle d'ARN pg et sert de substrat pour la transcriptase inverse.

– Le transcrit de 2,4 kb (ARNm L), minoritaire chez les patients infectés par le VHB, est initié en amont de la région pré-S1 et code la grande protéine d'enveloppe LAgHBs.

– Le transcrit de 2,1 kb (ARNm M/S) permet la synthèse des deux autres protéines d'enveloppe M et S. Cette organisation complexe permet une régulation entre les différentes protéines S, M et L. Il doit y avoir un excès de protéine S par rapport à L afin d'éviter l'accumulation de la protéine L dans le réticulum endoplasmique (RE).

– Enfin, le transcrit de 0,8 kb (ARNmX) permet la synthèse de la protéine X (HBx).

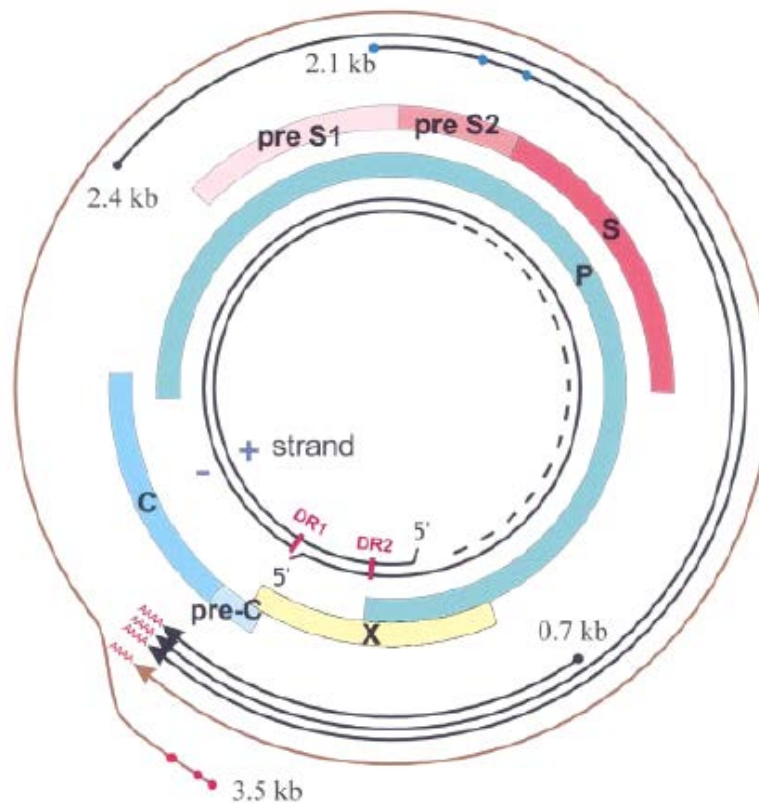


Figure 10 : Les ARN du VHB (et phases de lecture).
(D'après Kidd-Ljunggren, 2002).

– Reconstitution de la particule virale et réplication du génome viral

L'assemblage de la nucléocapside s'effectue dans le cytoplasme et implique des interactions fines entre les protéines de capsid, la polymérase et l'ARNpg qui est encapsidé car il est le seul à posséder le signal d'encapsidation structuré en tige-boucle. L'ARNpg est copié en un ADN (-) de 3182 nucléotides, grâce à la transcriptase inverse virale qui utilise comme amorce la protéine terminale. La RNase H dégrade la matrice ARNpg sauf une courte séquence DR1. Celle-ci va servir d'amorce à la synthèse du brin (+). Cette synthèse à partir du brin (-) s'interrompt de façon aléatoire laissant au moment de l'encapsidation une région simple brin sur une partie plus ou moins importante du génome.

– Bourgeonnement et sécrétion des particules virales

Le bourgeonnement des particules virales autour de la nucléocapside s'effectue dans un compartiment pré-golgien, le réticulum endoplasmique (RE), correspondant au site de maturation des trois protéines d'enveloppe L, M et S. Seules les protéines L et S sont indispensables à la sécrétion des particules infectieuses (**Bruss V and Ganem D, 1991 ; Bruss et al., 1996**). Les domaines pré-S1 et pré-S2 de la protéine L sont présents du côté cytosolique et assurent l'interaction avec la nucléocapside. Les virions sont assemblés par regroupement des protéines S majoritaires et le bourgeonnement s'effectue à l'intérieur des compartiments intermédiaires. Les particules virales sont transportées jusqu'à l'appareil de Golgi où se produit la glycosylation des protéines de l'enveloppe. Certaines nucléocapsides ne sont pas enveloppées et retournent dans le noyau où elles sont désassemblées entraînant la libération du génome viral et redémarrage d'un nouveau cycle de multiplication (Figure 11). Cette étape permet le maintien d'un "pool" d'ADNccc dans le noyau de l'hépatocyte, ce qui rend difficile l'élimination totale du virus par les traitements antiviraux. Les virions sont libérés sans doute par exocytose à partir des vésicules de Golgi.

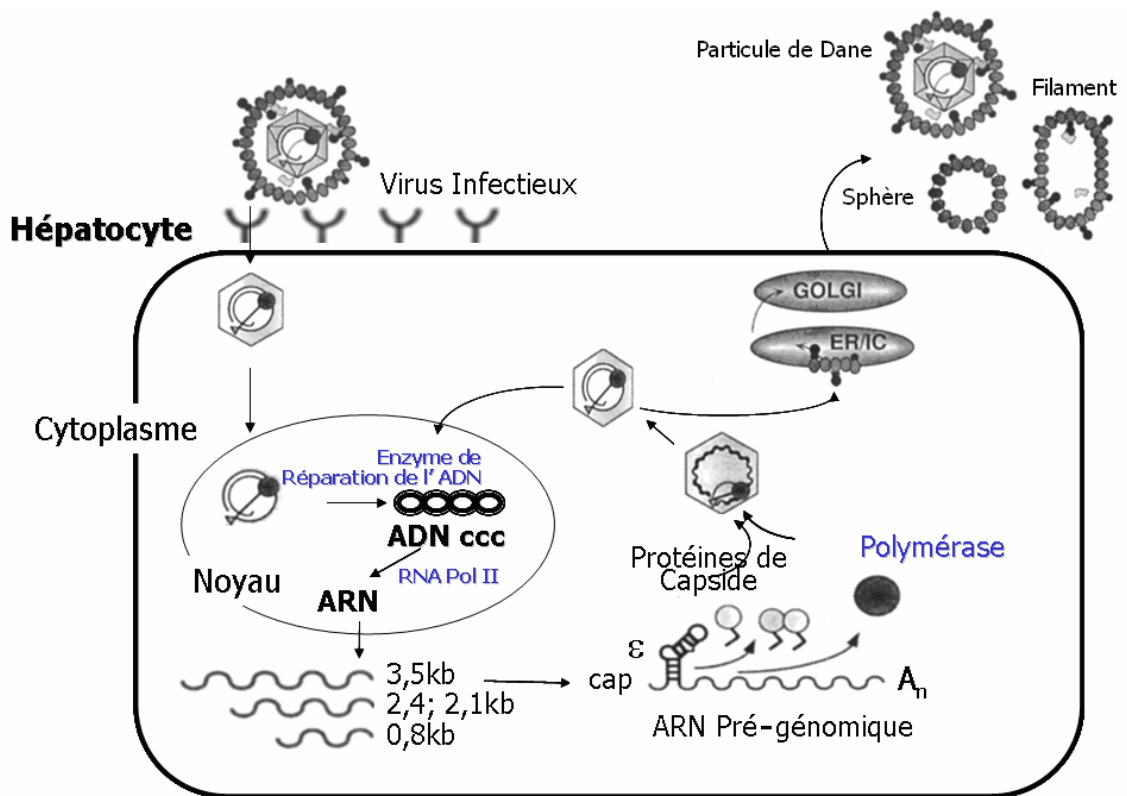


Figure 11 : Cycle de répliation du virus de l'hépatite B.

L'attachement sur l'hépatocyte se fait par le domaine pré-S1 de la grande protéine d'enveloppe. L'ADN viral est complété par la polymérase virale associée au virion en ADN bicaténaire, circulaire covalamment clos (ADNccc) et superenroulé. Il est transcrit en ARN messagers et en ARN pré-génomique. Ce dernier est incorporé dans les nouvelles capsides où la polymérase virale, fonctionnant comme transcriptase inverse, le rétro-transcrit en ADN génomique. Les protéines d'enveloppe produites en grand excès s'assemblent dans le sérum en particules sous formes de sphères et bâtonnets, à côté des particules de Dane, minoritaires, qui sont les seules particules infectieuses. (D'après Gordien E, Cours Virus de l'hépatite B : Actualités virologiques, Institut Pasteur, Paris. Mai 2006).

1.2.8. La variabilité du génome du VHB

Malgré un génome de petite taille (3200 pb) et un chevauchement des cadres de lecture, le génome du VHB présente des variations de séquence importantes. La polymérase virale (mais aussi l'ARN polymérase cellulaire) est une enzyme qui ne possède pas d'activité exonucléasique 3' et qui ne corrige donc pas les erreurs de lecture. Il existe au moins une mutation tous les 10^4 à 10^5 nucléotides. Les génomes produits

présentent donc de nombreuses mutations dont un grand nombre est incompatible avec une multiplication virale. Cependant, malgré la condensation de l'information, environ 10 à 20% du génome du VHB est susceptible de variation sans perte de la capacité répliquative. Chez un patient avec une infection chronique, avec le temps des mutations s'accumulent et plusieurs souches virales peuvent co-exister (quasi-espèces). L'existence de ces quasi-espèces complique l'étude du virus car souvent seul le type dominant est caractérisé.

Les études de séquences d'ADN viral permettent en principe d'étudier l'évolution du génome chez les patients et ainsi de corréler les modifications de séquence de l'ADN viral à des événements cliniques. Mais en fait, de telles variations sont difficiles à étudier et les données principales concernant les relations mutations/évolutions cliniques proviennent de la comparaison de souches de patients présentant différentes manifestations cliniques ou à différents stades de l'infection : hépatites aiguës, fulminantes, persistantes, chroniques actives et CHC.

1.2.8.1. Conséquences de la variabilité génomique du VHB

– Mutations du gène préS/S

Sérotypes

L'antigène HBs présente un déterminant « *a* » commun à toutes les souches du VHB. Ce déterminant qui appartient à la protéine S est une épitope conformationnel. L'antigène HBs existe sous deux formes *i/t* correspondant respectivement aux acides aminés *I/T* en position 126. Le déterminant « *a* » est associé à deux autres déterminants sous deux formes mutuellement exclusives *d/y* (**Le Bouvier, 1971**) et *w/r* (**Bancroft et al., 1972**)

dont les positions déterminent les sous-types d'AgHBs. La substitution d'une lysine en une arginine convertit « *d* » en « *y* » en position 122 et « *w* » en « *r* » en position 160 (**Okamoto et al., 1987**). Quatre sous-types principaux sont possibles : *ayr*, *ayw*, *adr*, *adw*. Les sous-types peuvent être associés mais, ils n'ont pas de signification claire. Ces sérotypes, stables, sont définis par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ils ne sont pas liés à une propriété biologique particulière de ces souches et leur étude n'a qu'un intérêt épidémiologique.

Génotypes

La population du VHB humaine est classée en génotypes. Ceux-ci sont définis comme possédant entre eux au moins 8% de divergence de la séquence nucléotidique complète (**Norder et al., 1992; Magnius et Norder, 1995; Norder et al., 2004**). Ils sont déterminés à partir de la région PrÉS2 dans la plupart des cas. Actuellement 8 génotypes sont identifiés, représentés de A à H (Figure 12). Le génotype A est ubiquitaire mais prédomine en Europe du Nord-ouest, en Amérique du Nord et en Afrique Centrale. Les génotypes B et C sont limités à l'Asie (Indonésie, Chine, Japon, Corée, Vietnam). Le génotype D est fréquent sur le pourtour du bassin méditerranéen et au Moyen-Orient. L'Afrique de l'ouest est le foyer principal du génotype E. Le génotype F est prédominant en Amérique Latine et Centrale et en Polynésie (**Magnius et Norder, 1995; Arauz-Ruiz et al., 1997; Van Geyt et al., 1998**). Le génotype G a été identifié aux Etats-Unis et en France (**Stuyver et al., 2000**). C'est le seul génotype qui semble ne pas être associé à un foyer principal. Le génotype H a été récemment décrit chez les Amérindiens en Amérique centrale et aux USA (**Arauz-Ruiz et al., 2002**). La présence de plusieurs génotypes dans une population s'explique par l'immigration. En effet, la plupart des villes comportant plusieurs génotypes sont des villes cosmopolites.

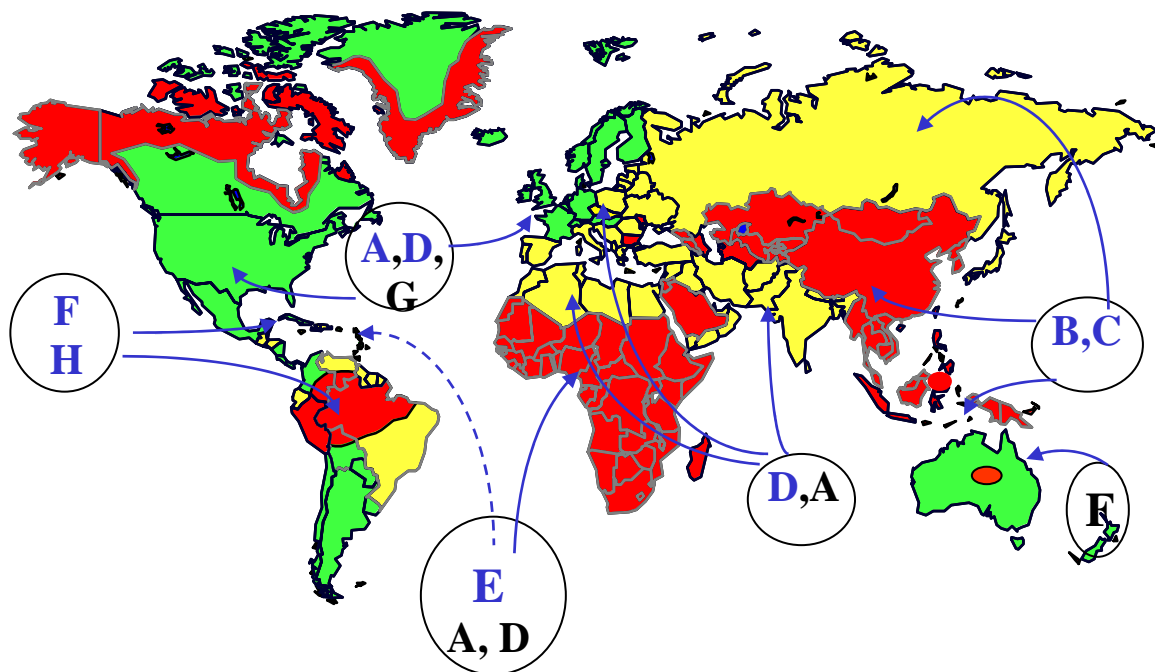


Figure 12 : Répartition géographique des génotypes A à H du VHB.

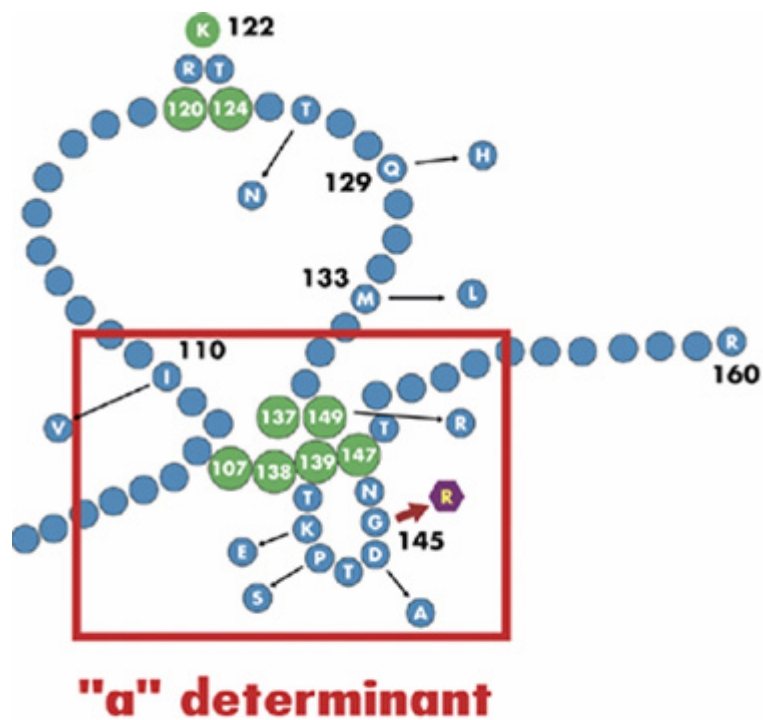
A : Europe, Afrique Centrale, Amérique ; B et C : Asie de l'Est, Polynésie ; D : Méditerranée - Asie du Sud-Est ; E : Afrique sub-saharienne ; F : Amérique latine, Polynésie G : USA, France ; H : Amérique Centrale, USA (Adapté de : <http://www.who.int/vaccinesurveillance/graphics/htmls/hepbvpr.htm>)

– Mutants antigène HBs (–) ou mutants d'échappement à la vaccination

Le segment S est le plus important puisqu'il porte un épitope majeur pour la protection contre l'infection. L'utilisation de la vaccination dans les pays à forte prévalence d'hépatite B s'est accompagnée de l'émergence de souches portant des mutations sur le gène S (Carman et al., 1990; Harrison et al., 1991; Fujii et al., 1992). Plusieurs mutations dans la région correspondant au déterminant « a » ont été décrites dont la plupart sont uniques (Figure 13). La variation la plus fréquente est le remplacement de la glycine (G) en position 145 par une arginine (R) (Fujii et al., 1992), ce qui abolit la spécificité antigénique de la protéine S. Le déterminant antigénique majeur n'est plus reconnu par les anticorps dirigés contre l'AgHBs vaccinal. Ces variants, peu fréquents, posent le problème de la formulation future des vaccins avec incorporation éventuelle des protéines mutées en position 145. La modification du

déterminant antigénique entraîne aussi l'absence de détection de l'AgHBs et les tests diagnostiques sont alors pris en défaut. Les souches portant cette mutation coexistent souvent avec les souches sauvages chez la mère infectée et peuvent être transmises à l'enfant (**Okamoto et al., 1992; Yamamoto et al., 1994**). Elle a été mise en évidence chez les nouveaux-nés de mère antigène HBe (+) qui, malgré la vaccination contre le VHB et la présence d'anticorps anti-HBs l'ADN viral sérique était détecté. La vaccination à la naissance favorise l'infection de l'enfant par ces souches qui conservent leur pouvoir infectieux. Il est vraisemblable que leur prévalence va augmenter avec le temps et cette mutation pourrait se répandre du fait de l'extension de la pratique vaccinale.

Chez les patients infectés par le VHB et qui reçoivent une greffe hépatique, la recolonisation du greffon est assurée le plus souvent par de telles souches qui échappent à l'immunothérapie massive avec des immunoglobulines spécifiques qui leur sont administrées.



Légende

- acides aminés
- cystéines impliquées dans les ponts di-sulfure
- mutation avec perte de la spécificité HBs
- sites déterminant les sous-types

Figure 13 : Principales mutations décrites sur le déterminant «a» de la protéine S.

La région portant le déterminant «a» a été détaillée et les différentes mutations décrites sont indiquées. La mutation G145R est la plus fréquente. Les acides aminés apparaissant en vert sont impliqués dans des ponts di-sulfure. (Carman et al., 1990).

– Mutations du gène *préC/C* et les hépatites sans AgHBe

Au cours de l'évolution de l'hépatite chronique active, la protéine E cesse d'être produite et cette disparition de l'antigène HBe s'accompagne de l'apparition d'anticorps anti-HBe. C'est la séroconversion « e » qui se traduit souvent par une diminution importante de la répllication et le virus peut devenir indétectable dans le sérum.

Cette évolution est liée à la survenue d'une mutation dans *préC* (Figure 14A). Ces mutants ont été décrits pour la première fois en Italie (**Brunetto et al., 1993**). Ils sont caractérisés par l'absence de la production d'AgHBe alors que l'ADN viral est détectable. Dans la région *préC* une mutation entraînant le remplacement de la Glycine (G) en position 1896 par une Alanine (A) se traduit par l'apparition d'un codon stop (UAG) à la fin de *preC* (Figure 14B). La synthèse d'une protéine tronquée se traduit par l'arrêt de production de l'AgHBe mais, la synthèse de la protéine C (AgHBc) n'est pas altérée et l'ADN viral reste détectable dans le sérum. Chez le patient infecté par un tel virus, les anticorps anti-HBe sont détectables, soit du fait de l'existence à un moment donné de la maladie de virus sauvage (ou d'une population mixte : virus sauvage-virus mutants), soit d'épitopes communs aux protéines HBc et HBe. La mutation G1896A s'accompagne d'une évolution péjorative de l'hépatite. Il est vraisemblable que le mutant 1896A apparaît spontanément mais il devient peu à peu majoritaire avec la disparition de l'AgHBe. En cas de transmission au nouveau-né d'une telle souche, celui-ci a plus de risque de faire une hépatite symptomatique ou une forme fulminante.

D'autres mutations ont été décrites, notamment, celles affectant le promoteur basal du core : A1762T (Thréonine) et G1764A (**Takahashi et al., 1995; Baumert et al., 1996**). Ces mutations ont été associées à des hépatites actives sévères observées après une transplantation hépatique et à des hépatites fulminantes.

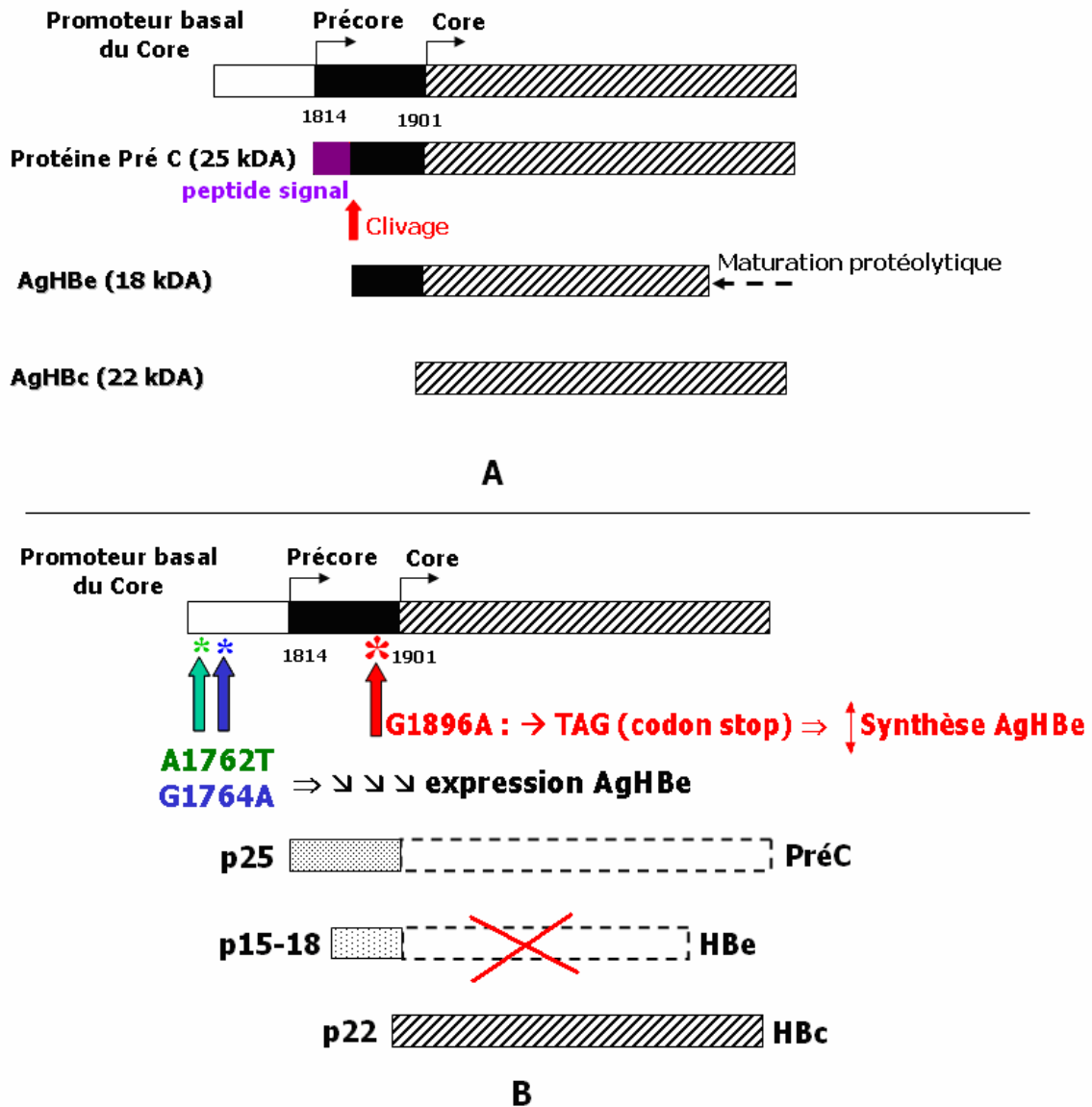


Figure 14 : Structure du gène codant les protéines HBc et HBe et émergence des mutants précocore.
 A : virus « sauvage » qui produit les deux protéines ; B : la mutation principale G1896A qui entraîne l'apparition d'un codon stop (TAG) et abolit la synthèse de la protéine HBe et les deux mutations A1762T et G1764A du promoteur basal du core qui diminuent l'expression de l'AgHBe. (D'après Gordien, Cours Virus de l'hépatite B : Actualités virologiques, Institut Pasteur, Paris. Mai 2006).

– Mutations du gène *P* et la résistance au traitement

Le gène de la polymérase du fait de sa longueur est soumis à des variations importantes et souvent une mutation retentit à la fois sur la polymérase et sur les gènes chevauchants. Cependant, la perte de fonction de ce gène n'est pas envisageable puisqu'il est nécessaire à la réplication virale. Une mutation au site actif peut entraîner une

résistance à un antiviral tout en conservant la capacité répliquative. Par exemple la modification du motif YMDD en YVDD ou YIDD entraîne une apparition d'une résistance à la lamivudine (**Thibault et al., 1999**). Une autre mutation qui se traduit par la modification L528M est associée aux précédentes (**Allen et al., 1998**). A l'arrêt du traitement par lamivudine, une réversion vers le motif YMDD peut être observée (**Chayama et al., 1998**).

– Mutations du gène X et le carcinome hépatocellulaire

La protéine X est très étudiée afin de tenter de déterminer son rôle éventuel dans la survenue du CHC. Les études de mutations ponctuelles ont montré que la protéine X interagit avec plusieurs systèmes de signalisation intra-cellulaire (activation de NF- κ B par exemple) et possède un rôle anti-apoptotique. Mais les séquences de la protéine naturelle varient considérablement d'un individu à l'autre et la protéine sauvage peut être présente au cours d'un CHC. La comparaison des séquences de virus circulant chez des patients ayant un CHC ou une hépatite chronique montre une accumulation de mutations en cas de CHC (**Venard et al., 2000**). Mais cette observation est peut être simplement le fait d'une plus longue évolution de la maladie. Ce type d'étude est difficile car très souvent dans les cancers hépatiques liés au VHB, le virus ne se réplique plus et des séquences virales peuvent être intégrées dans le génome de l'hépatocyte.

En revanche des délétions ou des insertions dans la région du promoteur de préC/C correspondent souvent à la production d'une protéine X tronquée avec une altération de la fonction transactivatrice de X portée par l'extrémité carboxy-terminale en 3' (**Wei et al., 1995**). Ces virus perdent en général leur capacité répliquative à moins d'être associés à un virus qui exprime la protéine X complète. Par exemple un virus qui présente une

délétion en 1768-1775 a une très faible réplication et aucun des marqueurs sérologiques de l'hépatite B n'est détecté chez les patients infectés (**Günther et al., 1999**).

1.3. EPIDEMIOLOGIE

1.3.1 Répartition mondiale

Le VHB est un virus ubiquitaire mais les porteurs chroniques qui constituent le réservoir du virus, sont inégalement répartis sur le globe. On peut définir ainsi trois zones d'infections persistantes (Figure 15) :

– Les zones de forte endémie, telles que l'Afrique sub-saharienne, l'Asie du Sud-est et le bassin amazonien, où 7 à 20% de la population sont des porteurs chroniques (présence de l'antigène de surface du VHB (AgHBs) dans leur sérum.

– Les zones de moyenne endémie qui sont l'Europe du Sud et de l'Est, le bassin méditerranéen, le Moyen-Orient, une partie de l'Amérique Centrale et de l'Amérique du Sud ont une prévalence de 2 à 7% de porteurs chroniques de l'AgHBs.

– Les zones de faible endémie, telles que l'Amérique du Nord, l'Europe occidentale et du Nord, l'Australie et la Nouvelle Zélande où le taux de porteurs chroniques du VHB est inférieur à 2%. Dans ces régions, le pourcentage de porteurs chroniques peut cependant être plus élevé parmi les populations dites à risques, notamment les toxicomanes, les homosexuels, les sujets à partenaires multiples, les professionnels de la santé.

Geographic Pattern of Hepatitis B Prevalence

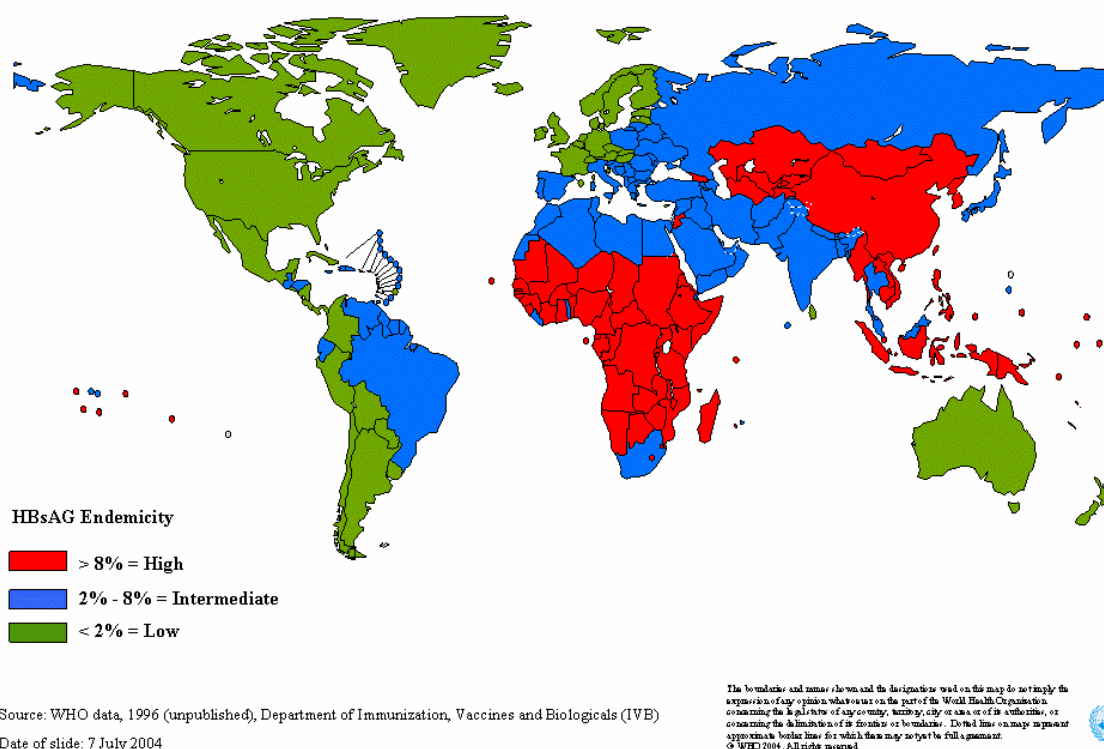


Figure 15 : Répartition mondiale de la prévalence de l'Hépatite B.
Les différentes couleurs indiquent les prévalences variables selon les régions.
<http://www.who.int/vaccinesurveillance/graphics/htmls/hepbprev.htm>

1.3.2. Modes de transmission

Le VHB est présent à une concentration élevée dans le sang des sujets ayant une hépatite B aiguë ou chronique (10^8 à 10^9 virions/mL dans le sang et ses dérivés, le sérum et les plaies). Il est également présent dans les sécrétions génitales, dans le sperme (10^7 virions/mL) et à concentration plus faible dans la salive, le lait, les urines et les larmes. Quatre principaux modes de transmission du VHB permettent de définir les populations à risques (Tableau I).

1.3.2.1. Transmissions parentérale et nosocomiale

La transmission parentérale est principalement représentée par la transfusion sanguine ou des dérivés sanguins au cours des traitements par les produits sanguins, et par la toxicomanie par voie veineuse. Les professionnels de santé (personnels soignants ou de laboratoire) étaient très exposés aux contaminations accidentelles par piqûre ou par contact avec des surfaces ou objets inertes (surfaces contaminées par des microgouttelettes de sang par exemple). Le risque d'infection lié à une piqûre est de 20 à 30%. On considère que la contagiosité sanguine du VHB est 10 fois supérieure à celle du virus de l'hépatite C et 100 fois plus élevée que celle du VIH. Cependant, grâce aux mesures d'éviction des donneurs de sang (dépistage de l'AgHBs obligatoire depuis 1971), le risque transfusionnel est très faible, évalué aux alentours de 1/100 000 en Occident (en France en particulier) (**Courouce et Pillonel J, 1996**). De plus, les sujets devant recevoir de grandes quantités de produits sanguins, comme les hémophiles, les thalassémiques, les drépanocytaires... sont désormais protégés contre cette infection par la vaccination. Il en est de même des hémodialysés, groupe à très haut risque d'infection. Les professionnels de santé sont obligatoirement immunisés grâce au vaccin. De plus l'amélioration de l'hygiène et la généralisation du matériel à usage unique ont fait régresser les risques d'infection. L'hépatite B transmise par voie parentérale est donc devenue très rare dans les pays occidentaux grâce à ces mesures de prévention, dépistage et couverture vaccinale. Un groupe à risque cependant échappe à ces mesures, ce sont les toxicomanes par voie intraveineuse qui restent la population la plus concernée par ce mode de transmission en pays développés. En effet, l'échange de matériel contaminé entre les toxicomanes serait responsable d'un quart d'hépatite B en Occident.

Dans tous les autres pays, la voie parentérale reste importante, notamment avec un risque transfusionnel très élevé et l'usage du matériel non jetable servant aux piqûres, incisions, tatouages, piercing, et à l'acupuncture.

1.3.2.2. Transmission sexuelle

La transmission sexuelle (par le sperme ou les sécrétions vaginales) est une source majeure d'infection par le VHB dans tous les pays du monde. Cette transmission est importante chez les homosexuels mais elle est également très fréquente par voie hétérosexuelle, aussi bien dans le sens homme-femme que femme-homme. L'hépatite B est l'infection sexuellement transmissible la plus fréquente (50 fois plus fréquente que l'infection par le VIH). Dans les pays occidentaux, c'est le principal mode de contamination (**LeFrère, 1996**).

1.3.2.3. Transmission verticale (périnatale ou materno-fœtale)

La transmission mère-enfant est un facteur très important de dissémination du VHB dans les régions de forte endémie comme l'Asie du Sud-est et l'Afrique sub-saharienne (**Edmunds et al., 1996**). Elle s'effectue essentiellement à partir de femmes porteuses chroniques du virus au moment de l'accouchement, par l'intermédiaire du sang maternel contaminé ou par les sécrétions cervicales et vaginales. La transmission en cours de grossesse est rare car le passage transplacentaire du virus est exceptionnel. La transmission verticale est conditionnée par l'importance de la réplication du VHB chez la mère dont l'AgHBe est le témoin sérologique. Si la mère est infectée et possède l'AgHBe, le risque de transmission est proche de 100% (**Beasley et al., 1977**). Si l'AgHBe est absent, ce risque est moindre (10 à 15%).

1.3.2.4. Transmission horizontale

La transmission horizontale du VHB est importante étant donné le taux élevé du virus au niveau des plaies et de la salive chez un sujet infecté. La transmission du VHB entre enfant est très fréquente. Elle se produit habituellement en milieu familial, mais aussi dans les crèches et à l'école. Elle résulte le plus souvent du contact étroit des lésions cutanées ou des muqueuses avec du sang ou des sécrétions de plaies au cours des jeux d'enfants, ou de pratique de sports de combat. Le virus peut être transmis par contact avec la salive à la suite des morsures ou d'autres effractions cutanées. La transmission par la salive est également favorisée par les mauvaises conditions d'hygiène et la promiscuité (Martinson et al., 1998; Zhevachevsky et al., 2000). En effet, le VHB peut être transmis par des objets partagés tels que les brosses à dents ou des rasoirs où il peut être présent à forte concentration.

Tableau I : Principaux modes de transmission du virus de l'hépatite B

Parentérale et nosocomiale	Verticale (périnatale ou Materno-foetale)
<ul style="list-style-type: none"> - Transfusion : Sang et ses dérivés - Activité professionnelle - Greffes d'organes ou de tissus - Toxicomanie par voie veineuse - Tatouages ou piercing - Acupuncture 	<ul style="list-style-type: none"> - à l'accouchement - en période néonatale (passage transplacentaire exceptionnel) - Allaitement
Sexuelle	Horizontale (contact étroit)
<ul style="list-style-type: none"> - Hétérosexuelle - homosexuelle 	<ul style="list-style-type: none"> - Enfant-enfant (au cours des jeux, de la pratique de sport par contact avec les plaies) - Transmission intrafamiliale - Personnes à personnes (institutions pour malades mentaux et handicapés, prisons)

1.3.3. Histoire naturelle

L'histoire naturelle de l'infection par le VHB est complexe et varie selon les zones d'endémie. Elle est influencée par l'âge au moment de l'infection, le niveau de réplication virale et le statut immunitaire de l'hôte (**Fattovich, 2003**). Dans les régions de faible prévalence, l'infection a lieu durant l'adolescence ou à l'âge adulte et elle reste asymptomatique pour 90% des individus mais dans 10% des cas, elle donne lieu à une hépatite aiguë symptomatique après une incubation de deux à six mois. Excepté le cas des hépatites fulminantes, la majorité des patients développant une hépatite aiguë symptomatique ou non guérissent rapidement, mais 5 à 10% d'entre eux deviennent chroniquement infectés. En revanche dans les régions de forte prévalence, comme l'Asie du Sud-est et l'Afrique Sub-saharienne, la transmission se fait principalement de la mère à l'enfant et ce dernier développe une infection chronique dans 80% des cas (Figure 16), conduisant à assurer le maintien d'un niveau élevé de portage du VHB. Par ailleurs, des études épidémiologiques ont montré qu'il existe un lien très fort entre le développement de CHC et la persistance du virus dans le sang. En effet, le risque d'évolution vers la cirrhose et/ou le CHC est augmenté d'environ 100 fois chez un porteur chronique du VHB par rapport à un individu non infecté.

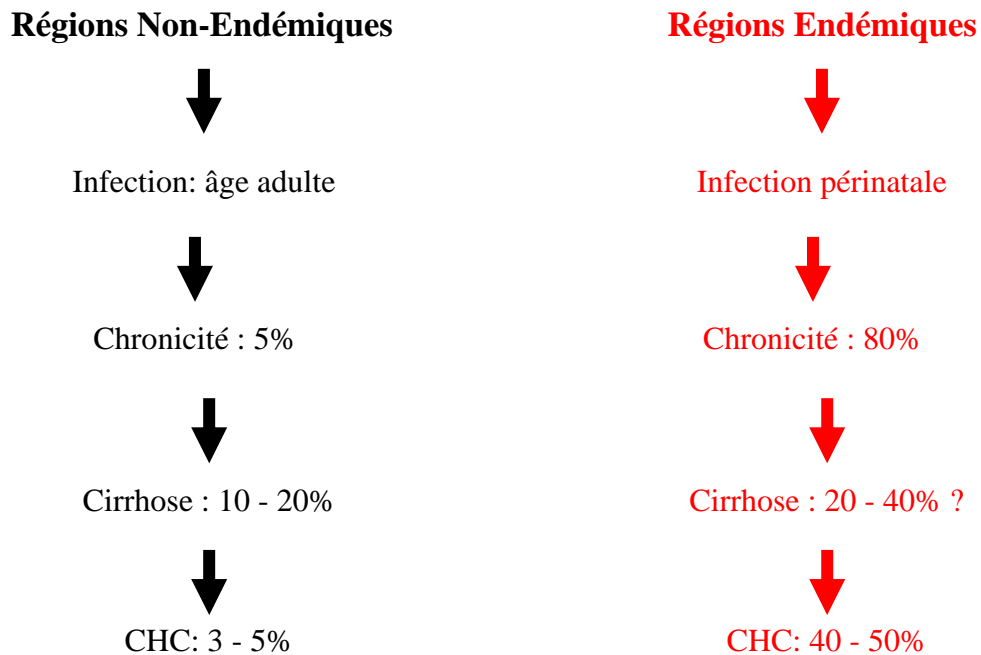


Figure 16 : Histoire naturelle de l'infection par le VHB selon les régions d'endémie.
(D'après Gordien E, Cours Virus de l'hépatite B : Actualités virologiques, Institut Pasteur, Paris. Mai 2006); CHC : carcinome hépatocellulaire.

1.4. POUVOIR PATHOGENE CHEZ L'HOMME

1.4.1. Physiopathologie

L'homme est le seul hôte naturel du virus. Le VHB pénètre par voie sanguine ou sexuelle et gagne le foie par voie sanguine. On ne connaît pas le site de multiplication primaire (s'il existe). Etant peu cytotytique, c'est l'intensité variable du conflit entre ce virus et les défenses immunitaires qui détermine la gravité de l'infection et le polymorphisme clinique de l'hépatite B. Les défenses immunitaires mettent en jeu deux mécanismes : les lymphocytes T qui attaquent et détruisent les cellules malades, les lymphocytes B qui synthétisent les anticorps spécifiques neutralisant les virus circulants.

En effet, les épitopes viraux portés par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I présents à la surface des hépatocytes seraient reconnus par les lymphocytes CD8 spécifiques entraînant la lyse cellulaire. Cette immunité est dirigée contre les antigènes de la protéine du core (AgHBc). Par contre les protéines d'enveloppe éventuellement présentes à la surface de la cellule seraient plutôt la cible de l'ADCC (antibody dependant cellular cytotoxicity) médiée par les lymphocytes « Natural Killer » (NK). La neutralisation par les anticorps circulants des virions libérés et la destruction des cellules infectées permet d'éliminer le virus de l'organisme. Si la réponse immunitaire n'est pas adaptée une hépatite chronique peut s'installer. Si le système immunitaire réagit de façon excessive, une hépatite fulminante est observée.

1.4.1.1. Hépatite B aiguë

– Incubation

Après la contamination, l'incubation est longue et peut durer de 30 à 120 jours (en moyenne 10 semaines). En fin de période, des manifestations pseudo-grippales (fièvre, frissons, céphalées, myalgies, douleurs articulaires) et, dans la moitié des cas, de troubles digestifs peuvent être observés.

– Phase d'état

Chez 20 à 30% des patients, la phase d'état est symptomatique, avec un ictère d'intensité variable, des urines peu abondantes et foncées, des selles normales ou décolorées, un prurit inconstant. Le foie est de volume normal ou légèrement augmenté. L'ictère décroît progressivement, en deux à six semaines. Fait important pour le

diagnostic d'hépatite aiguë, il existe une augmentation marquée des transaminases sériques.

– Guérison

Chez 90 à 95 % des adultes l'hépatite aiguë guérit sans séquelle en laissant une immunité protectrice.

– Formes cliniques

Hépatite asymptomatique

On distingue des formes anictériques dans 70 à 80% des cas. La symptomatologie est directement liée à l'âge et l'infection est le plus souvent asymptomatique chez le jeune enfant.

Hépatite fulminante

Les formes avec insuffisance hépatocellulaire grave : hépatites fulminantes ou subfulminantes (0,1% des cas), avec nécrose hépatique massive qui s'accompagne d'un ictère à bilirubine conjuguée, d'une atrophie hépatique avec une transaminasémie très élevée et syndrome hémorragique dû, en partie, au défaut de synthèse des facteurs de coagulation fabriqués par le foie, et en partie à des phénomènes de coagulation intra-vasculaire. La mortalité globale est de l'ordre de 80% en l'absence de greffe hépatique. Le VHB est à l'origine de 70% des hépatites fulminantes virales.

1.4.1.2. Hépatite B chronique

Elle se développe au décours d'une hépatite aiguë symptomatique ou asymptomatique. Elle se définit par la persistance des anomalies cliniques, biochimiques

et la présence de l'AgHBs au-delà de six mois après le début d'une hépatite aiguë. Le risque d'évolution vers la chronicité dépend de l'âge du patient et de son système immunitaire. Elle survient avec une fréquence allant de 5 à 10% chez l'adulte immunocompétent jusqu'à 90% chez les nouveaux-nés infectés ou chez les sujets immunodéprimés ou souffrant de maladies débilitantes.

– Portage inactif

Dans 1/3 des cas, le portage chronique se déroule sans aucune lésion hépatique. Dans cette phase, le génome viral se réplique à bas bruit dans les hépatocytes infectés. La faible expression des antigènes viraux et notamment de capsidite réduit donc l'attaque des cellules infectées par la réponse immune cellulaire. Le contrôle de l'infection virale se caractérise par la séroconversion « e » avec négativement de l'AgHBe, apparition d'anticorps anti-HBe, normalisation complète des transaminases et l'absence de signes d'inflammation hépatique sur la biopsie. Les sujets sont des porteurs « inactifs » mais pouvant être contagieux. Il persiste toutefois dans le tissu infecté des cellules comportant l'ADNccc qui peut être à l'origine d'une réactivation virale sous la forme d'un virus sauvage ou d'un mutant précore, et des cellules comportant le génome viral intégré dans le génome de l'hôte, pouvant être à l'origine de l'oncogenèse viro-induite

– Hépatite B chronique persistante

Dans 1/3 des cas, ce portage chronique s'accompagne de lésions histologiques stables et sans gravité.

– Hépatite B chronique active

En revanche, 1/3 des cas évolue en hépatite chronique active ou agressive s'accompagnant d'une réaction immunitaire forte avec nécrose hépatocytaire et inflammation portale sévère d'évolution péjorative.

– Complications de l'hépatite B chronique

Cirrhose virale B

La cirrhose est une forme sévère d'évolution de l'hépatite B chronique. Progressivement, les cellules détruites sont remplacées par du tissu cicatriciel et l'hépatite évolue ainsi vers la cirrhose. Dans le parenchyme hépatique, il existe des nodules de régénération au sein d'une fibrose. Ces foyers pourraient provenir d'une prolifération d'un seul hépatocyte. A un stade tardif, les signes cliniques d'insuffisance hépatocellulaire ou d'hypertension portale apparaissent. L'évolution se fait vers une insuffisance hépatique pouvant conduire au décès (Figure 17).

VHB et carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une tumeur épithéliale développée à partir des hépatocytes. Il représente la forme majoritaire de cancer primitif du foie. Cette tumeur au pronostic sévère vient au 5ème rang mondial pour la fréquence des cancers humains, et au 3ème rang pour les causes de mortalité par cancer. Le CHC constitue un problème majeur de santé publique, en particulier dans les pays de forte endémie du VHB (Asie, Afrique Sub-saharienne) où plus de 80% du total mondial de nouveaux cas apparaissent. En effet, l'association du VHB au cancer du foie repose sur des arguments épidémiologiques et moléculaires ; de plus des facteurs environnementaux interviennent

dans la carcinogénèse. Le CHC est un processus complexe qui comporte probablement plusieurs étapes et un temps de latence important entre l'infection primaire et l'apparition de la tumeur (20 à 50 ans). Le CHC survient généralement (mais pas toujours) sur une cirrhose préexistante, complication évolutive de l'hépatite chronique active. L'infection virale chronique pourrait jouer un rôle indirect en induisant une réponse immunitaire et une maladie nécro-inflammatoire, favorisant la libération de radicaux oxygénés, de cytokines et de facteurs de croissance. Dans ce contexte, la régénération hépatique serait accompagnée d'un risque accru de lésions de l'ADN et d'altérations génétiques. La survenue d'un certain nombre de CHC sur un foie non pathologique est un argument fort pour affirmer un rôle direct du VHB dans le processus tumoral. Cependant, le ou les mécanisme(s) exact(s) de survenue de cette carcinogénèse liée au VHB reste (nt) à déterminer. Même si l'évolution vers le CHC est multifactorielle, le rôle du virus reste déterminant (**Sitterling et al., 2000**).

– Les arguments épidémiologiques associent une superposition géographique des zones à forte prévalence de l'infection par le VHB et l'incidence du CHC. Ces études ont clairement montré qu'il existe une relation de cause à effet entre le portage chronique du VHB et le développement du CHC (**Szmunn W, 1978**). Palmer Beasley à Taiwan, a montré que le risque de développer un cancer du foie est 100 fois plus élevé chez les porteurs chroniques du VHB par rapport à une population non infectée (**Beasley et al., 1981**).

– Les arguments moléculaires reposent sur la détection de l'ADN du VHB dans les tissus tumoraux, traduisant une intégration clonale ou polyclonale (dans les tumeurs les plus évoluées) de l'ADN du VHB. Ces intégrations sont parfois en relation avec des gènes régulateurs cellulaires : souvent à proximité d'un oncogène de la famille myc dans 75 % des tumeurs expérimentales de la marmotte infectée par le WHBV

(**Buendia et al., 2000**) ; au niveau de la séquence du gène codant le récepteur β à l'acide rétinoïque ou du gène de la cycline A, dans des cas étudiés chez l'homme (**Wang et al., 1990**). L'expression de ces gènes, contrôlée alors par les séquences activatrices virales, échappe ainsi à la régulation cellulaire et entraînerait le développement du cancer.

Le génome viral ne semble cependant pas contenir d'oncogène mais, un rôle possible de la protéine HBx, du VHB a été évoqué. Par ailleurs, l'analyse des insertions virales dans le génome des hépatocytes humains a déjà révélé que la région codant la protéine HBx est insérée soit en totalité, soit elle génère une protéine tronquée dans sa partie carboxy-terminale en 3' (**Sirma et al., 1999 ; Murakami et al., 2005**). La mise en cause de la protéine X dans la survenue du CHC repose sur les principaux arguments suivants (**Yen, 1996**) :

L'ADN du virus de l'hépatite B du canard (DHBV) ne possède pas de gène X, et cet animal ne présente jamais de CHC. Par contre, la marmotte infectée par le virus de l'hépatite B (WHBV) qui possède une protéine X présente un CHC dans 100 % des cas dans les deux à quatre ans qui suivent l'infection (**Zoulim et al., 1994**).

Les souris transgéniques pour le gène X et les séquences en amont ont une fréquence anormale de survenue de CHC (**Kim et al., 1991 ; Terradillos et al., 1997**).

La transfection de cellules NIH 3T3 (fibroblastes embryonnaires de souris) avec le gène X entraîne leur transformation.

Dans les cellules de CHC, l'expression isolée du gène X peut être observée en l'absence de toute autre protéine virale (**Paterlini et al., 1995**).

Les propriétés de la protéine X communément admises, sa capacité à stimuler la transcription de manière indirecte de nombreux promoteurs viraux et cellulaires (transactivation) (**Rossner MT, 1992**), sont d'importance, lors de l'infection virale, par ses effets sur la transformation et la mort cellulaire (**Chirillo et al., 1997**).

Différents co-facteurs (agissant seuls ou en synergie avec les infections virales) comme le sexe masculin (rôle hormonal ?), la co-infection par le VHC ou le VHD, la consommation abusive d'alcool (responsable de l'apparition de cirrhose), le tabagisme ou encore une hémochromatose (surcharge en fer) peuvent être associés à un CHC. Le CHC peut également être lié à une mauvaise nutrition due à une contamination alimentaire par les aflatoxines (**Chen et al., 1997b**). Les aflatoxines sont des toxines produites par les champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Il existe plusieurs types d'aflatoxines mais seule l'aflatoxine B1 (AFB1) aurait un pouvoir cancérigène. La contamination se fait essentiellement lors du stockage des céréales (blé, riz, maïs, soja) ou des graines oléagineuses (arachides, cacao, pistaches) conservés à haute température (20 à 40°C) avec un degré d'humidité d'environ 80%. Dans les pays occidentaux, le niveau des aflatoxines dans les aliments à risque fait l'objet de contrôles réguliers. En revanche, dans les pays en développement (Afrique Subsaharienne, Asie du Sud-est, Amérique du Sud) où les conditions de stockage ne sont pas forcément surveillées, les adduits de l'aflatoxine sont retrouvés sur l'albumine dans le sérum de 95% de la population. En effet, plusieurs études ont montré que le risque de développer un CHC était multiplié par 7 en cas de présence de l'AgHBs dans le sérum et par 60 s'il y a infection par le VHB et exposition à l'AFB1 (**Ross et al., 1992; Chen et al., 1996 ; Buendia et al., 2000**). Dans ce contexte particulier, l'AFB1 peut induire la perte de fonction du gène *p53*, suppresseur de tumeur. La mutation la plus connue est une mutation spécifique du gène *p53* au codon 249 (Ser249). Elle a été retrouvée dans plus de 50% des cas de CHC. Ce « point chaud » de mutation correspond à une substitution de G en T entraînant le changement d'une arginine en une sérine sur la protéine p53 (**Chen et al., 1996**).

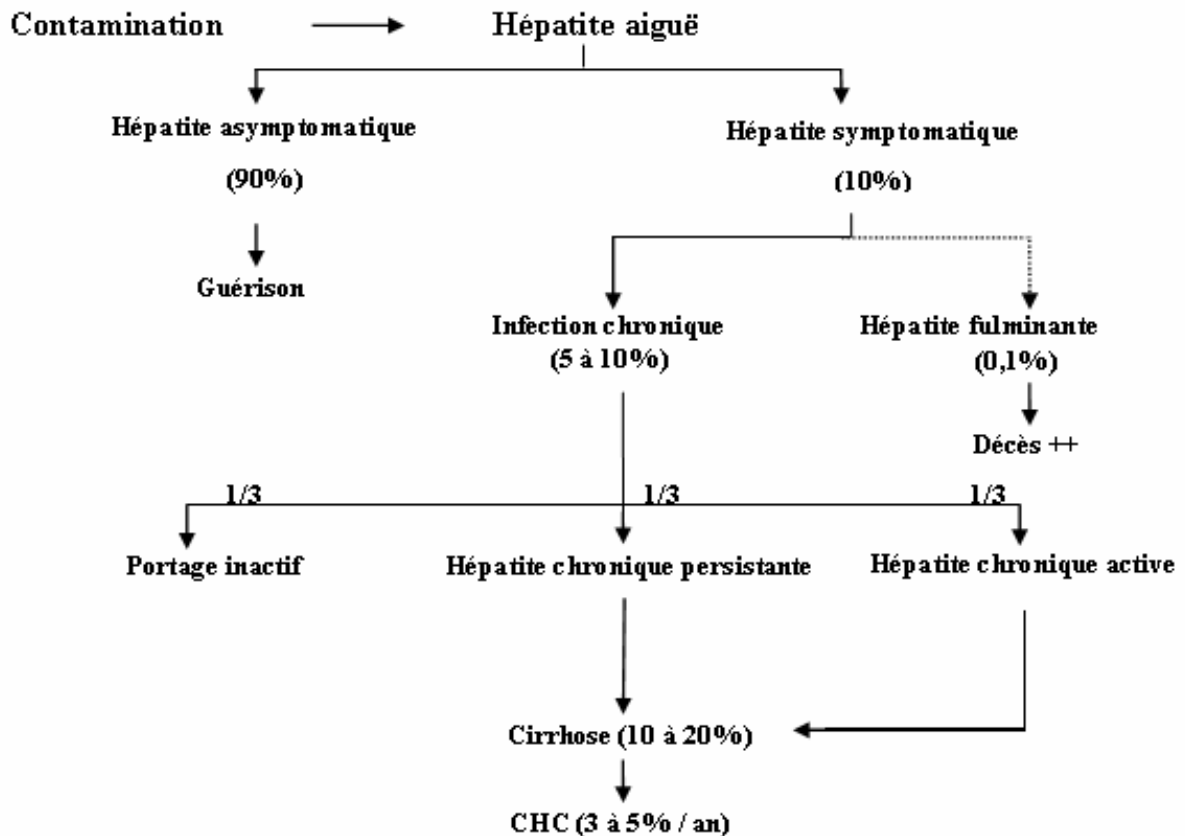


Figure 17 : Evolution de l'infection par le VHB chez un adulte immunocompétent dans les régions non endémiques.

1.5. DIAGNOSTIC DE L'HEPATITE B AU LABORATOIRE

Le diagnostic de l'infection par le VHB est très important et, se réalise selon un algorithme qui devrait être appliquée dans tous les laboratoires (Figure 18). Un prélèvement sanguin suffit pour établir le diagnostic. La disponibilité des tests performants pour une grande variété de marqueurs sériques permet un diagnostic précis des différents stades de l'infection.

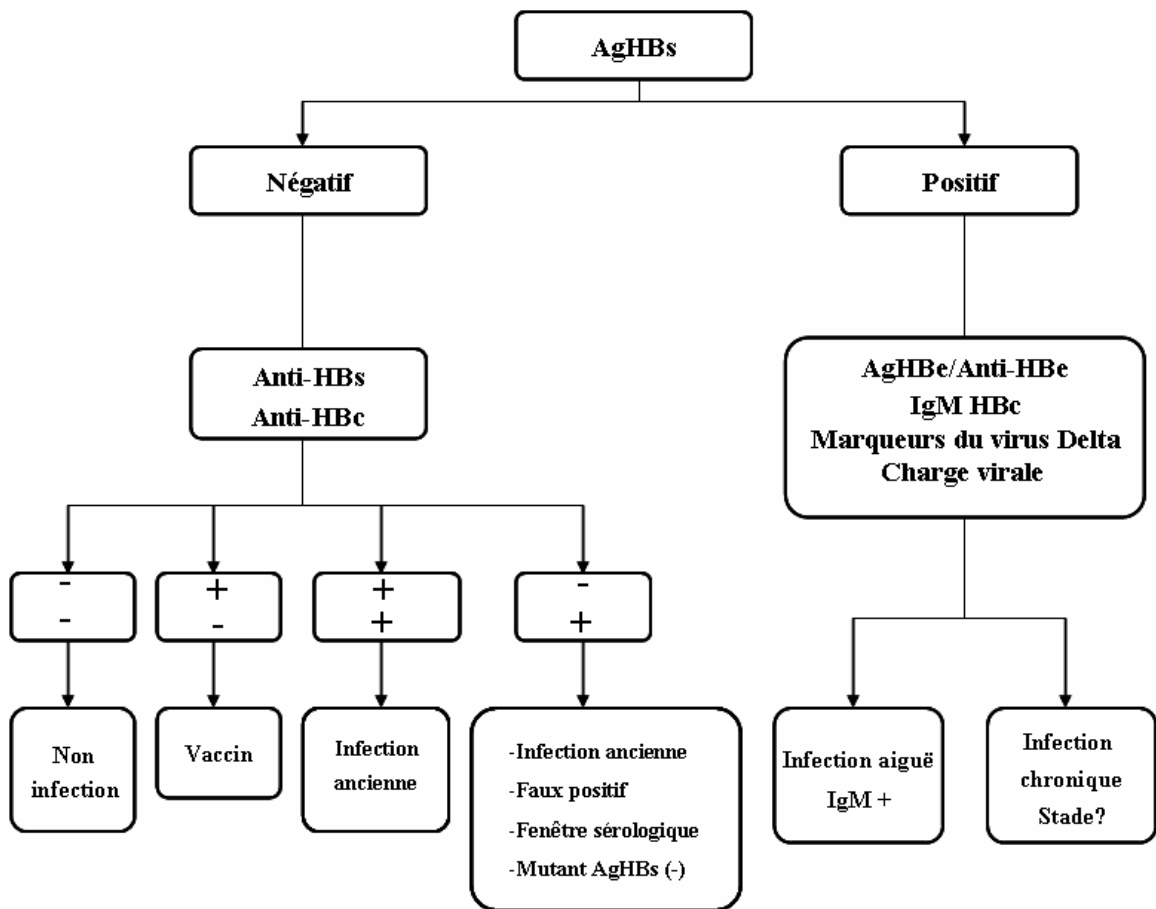


Figure 18 : Démarche diagnostique de l'infection par le VHB au laboratoire

1.5.1. Diagnostic Direct

C'est par définition la mise en évidence du virus et/ou des ses constituants.

1.5.1.1. Culture

La multiplication *in vitro* du VHB, est possible mais reste réservée au domaine expérimental.

1.5.1.2. Microscopie électronique

Les particules de Dane ainsi que les sphères et les filaments produits en excès peuvent être mis en évidence assez facilement dans le sérum par microscopie électronique mais cette technique qui nécessite de fortes concentrations de particules virales n'est pas utilisée en routine.

1.5.1.3. Recherche des antigènes viraux

En pratique, les antigènes HBs (AgHBs) et HBe (AgHBe) sont mis en évidence dans le sérum par des techniques immuno-enzymatiques chez les sujets porteurs du virus. L'élément essentiel du diagnostic d'une infection par le VHB en cours repose sur la mise en évidence dans le sérum de l' AgHBs. L'antigène HBe est recherché dans le bilan d'une hépatite chronique (tableau II).

L'AgHBc et l'AgHBs peuvent être détectés sur une coupe de foie par immunofluorescence ou immuno-peroxydase, lorsqu'une biopsie hépatique est réalisée.

1.5.1.4. Détection et quantification de l'ADN du VHB

L'ADN du VHB peut être détecté et éventuellement quantifié dans le sérum, soit par des techniques d'hybridation au moyen de sondes spécifiques, soit par amplification génique. Les techniques d'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) du génome viral sont les plus sensibles et permettent également après séquençage de révéler des variants ou mutants. La quantification permet de suivre l'évolution de la charge virale. Différentes techniques sont actuellement proposées :

- L'Hybridation avec amplification du signal (Hybrid capture HBV DNA, Laboratoires Abbott) utilisant des isotopes, n'est plus utilisée

- L'ADN branché : Quantitex HBV DNA assay (bDNA), Laboratoires Bayer
- La PCR : Cobas Amplicor™ HBV MONITOR Test, Roche Diagnostics
- Les PCR en temps réel : Real Time™ HBV PCR Kit, Laboratoires Abbott et Real Time PCR System Cobas TaqMan 48, Roche Diagnostics

– Indications de la recherche de l'ADN viral

La recherche de l'ADN viral est utilisée pour :

- Le dépistage et la détection précoce de l'infection (1 semaine)
- Aider à l'interprétation d'une sérologie non informative : Anticorps anti-HBc isolés
- La recherche d'ADN en cas d'hépatite chronique Ag HBe (–)
- Une recherche de réactivation du VHB chez un immunodéprimé
- Evaluer l'efficacité d'un traitement
- Fournir un marqueur prédictif de réponse après traitement
- Faire la distinction entre porteurs sains d'AgHBs et porteurs chroniques asymptomatiques
- Inclure des patients dans des protocoles thérapeutiques

1.5.2. Diagnostic indirect

C'est la recherche de la réaction immunologique de l'hôte. Le diagnostic sérologique permet la recherche et éventuellement la quantification des anticorps dirigés contre les différents antigènes viraux : anticorps anti-HBs, anticorps anti-HBc totaux et dans la fraction IgM et anticorps anti-HBe. L'interprétation des marqueurs sérologiques du VHB est présentée dans le tableau II.

Tableau II : Interprétation des marqueurs sérologiques du VHB

Marqueurs sérologiques	Signification clinique
AgHBs	- Infections aiguë et chronique
AgHBe	- Marqueur de réplication virale - Infection débutante et chronique
IgM anti-HBc	- Infection récente - Infection chronique (mauvais pronostic)
Ig totales anti-HBc	- Témoin de contact avec le virus
Ac anti-HBe	- Suivi de traitement - Hépatite AgHBe (-)
Ac anti-HBs	- Guérison - Immunité (naturelle ou vaccinale) - Protection (si titre ≥ 10 UI/L)

1.5.3. Cinétique des marqueurs

1.5.3.1. Au cours d'hépatites aiguës d'évolution favorable

Après un délai moyen de 4 à 12 semaines après le contage, l'AgHBs devient détectable dans le sérum. Cette présence peut précéder les signes biologiques (augmentation des transaminases) et l'ictère de 2 à 4 semaines. Il persiste de 4 à 8 semaines disparaissant plusieurs semaines après normalisation des transaminases. Les Ac anti-HBc apparaissent 2 à 4 semaines après la disparition de l'AgHBs et sont retrouvés dans la fraction IgM durant la primo-infection. La présence d'AgHBe signe la réplication virale, il disparaîtra avant l'Ac anti-HBs. Une évolution favorable est caractérisée par la normalisation des transaminases, la disparition de l'AgHBs et l'apparition des Ac anti-HBe et Ac anti- HBs (Tableau III; Figure 19).

Tableau III : Marqueurs des infections à VHB au cours d'hépatite aiguë d'évolution favorable

	Antigènes		Anticorps				ADN	ALAT
	HBs	HBe	Anti-HBs	Anti-HBe	IgM Anti-HBc	Ig Totales Anti-HBc		
Début hépatite	+	+	-	-	-	-	+	N
Phase aiguë	+	+	-	-	+	+	+	>N
Evolution favorable	+	-	-	+	+	+	±	N
Convalescence	-	-	-	+	±	+	-	N
Guérison	-	-	-	+	-	+	-	N
Infection ancienne	-	-	+	+	-	+	-	N
Vaccination	-	-	+	-	-	-	-	N

± : Inconstant (le marqueur désigné peut être présent ou non) ; + : Présent ; - : Absent
 ALAT : Alanine Aminotransférase ; N : Normale

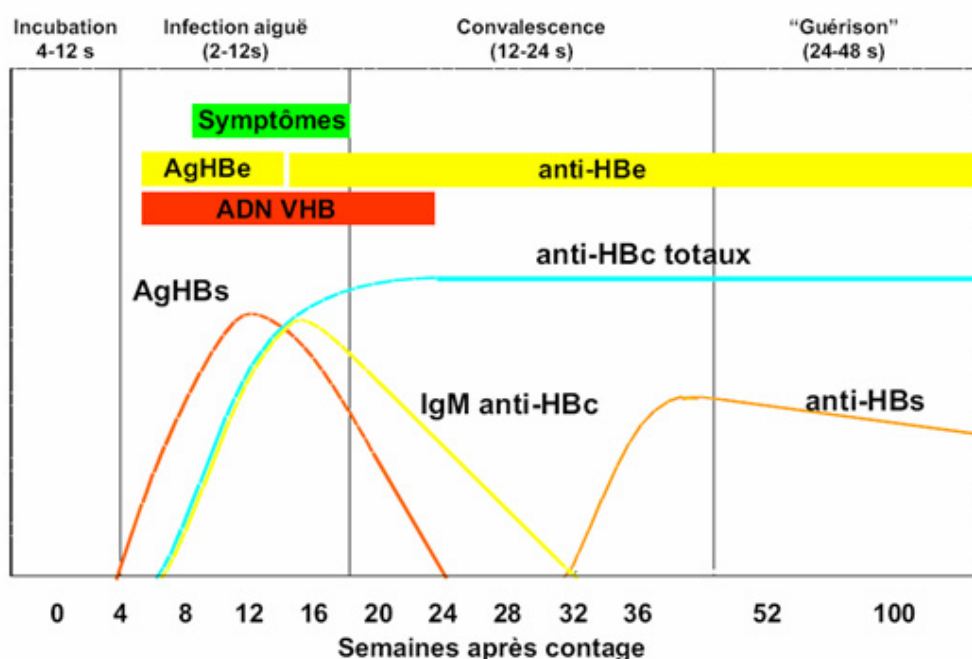


Figure 19 : Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite B aiguë (Adapté de : le CDC, <http://www.cdc.gov/ncido/diseases/hepatitis/b/index.htm>)

1.5.3.2. Au cours d'hépatites chroniques

Les profils sérologiques de l'hépatite chronique sont caractérisés par la persistance de l'AgHBs au delà de 6 mois, de l'AgHBe et des Ac anti-HBc. Les deux antigènes peuvent rester détectables durant plusieurs années, voire la vie entière. Parallèlement, les transaminases demeurent anormalement élevées. La séroconversion «e» peut survenir mais ne s'accompagne pas toujours de la disparition de l'ADN circulant. Une séroconversion «s» avec disparition de l'AgHBs et apparition de l'Ac anti-HBs à titre faible peut également survenir après plusieurs années. Le portage inactif est caractérisé par le portage chronique de l'AgHBs avec des transaminases normales à plusieurs reprises, une histologie hépatique normale, la présence d'Ac anti-HBe et une réplication virale non détectable. Des réactivations virales sont cependant possibles (Tableau IV; Figure 20).

Tableau IV : Marqueurs des infections chroniques à VHB

	Antigènes		Anticorps			ADN	ALAT
	HBs	HBe	Anti-HBs	Anti-HBe	Ig Totales Anti-HBc		
Porteur asymptomatique	+	+	-	-	+	+	N
Hépatite chronique active	+	+	-	-	+	+	> N
Hépatite chronique persistante	+	-	-	+	+	±	N ou >N
Hépatite chronique à mutants préC	+	-	-	+	+	+	> N
Evolution favorable	+	-	-	+	+	-	N

+ : Présent ; - : Absent

ALAT : Alanine Aminotransférase ; N : Normale

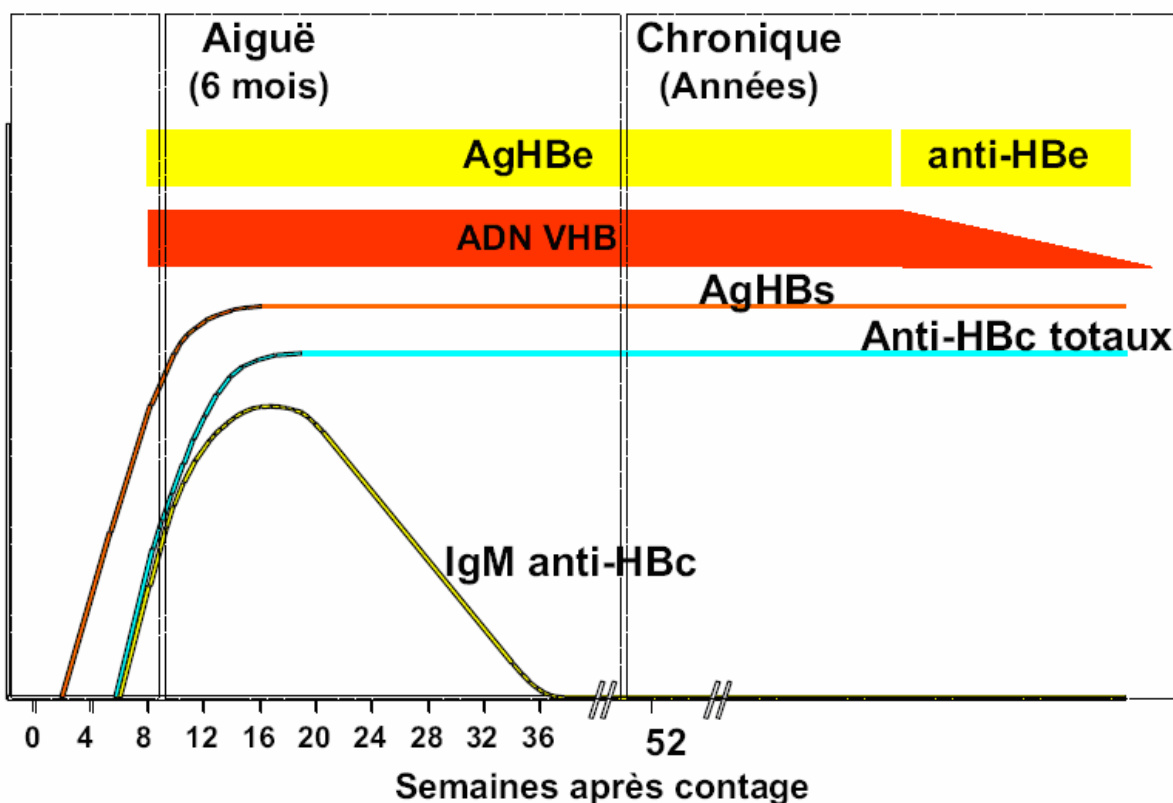


Figure 20 : Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite B chronique

(Adapté de : le CDC, <http://www.cdc.gov/ncido/diseases/hepatitis/b/index.htm>)

1.6. PREVENTION ET TRAITEMENT

1.6.1. Mesures préventives générales

Les modalités de transmission du VHB étant connues, la prévention repose sur des mesures générales visant à prévenir les maladies sexuellement transmises et les expositions au sang et aux produits biologiques. En milieu de soins, les conduites à tenir et le matériel à utiliser doivent être bien définis. Elles concernent le personnel mais aussi les patients porteurs de virus. Des mesures spécifiques consistent à exclure du don de sang, de tissus ou d'organes les sujets porteurs de l'AgHBs et/ou de l'anticorps anti-HBc. Actuellement la recherche de l'ADN viral dans ces situations n'est pas faite. Les dons en

lactarium doivent également être contrôlés et les dérivés du sang stables sont sécurisés. Enfin, il faut également lutter pour un respect scrupuleux des règles d'hygiène non seulement en milieu médical mais également à domicile dans l'entourage d'un patient infecté.

1.6.2. Immunothérapie passive par les immunoglobulines spécifiques anti-HBs

Les immunoglobulines spécifiques anti-HBs (IgHB) provenant de donneurs immunisés contre le VHB sont utilisées pour l'immunisation passive après exposition au virus, notamment :

- chez tout nouveau-né de mère positive pour l'AgHBs
- en cas de contamination accidentelle (piqûre, blessure) par du sang ou des produits sanguins positifs pour l'AgHBs chez un sujet non vacciné
- après transplantation hépatique chez un sujet porteur du virus afin de prévenir la réinfection du greffon en neutralisant les particules virales circulantes.

Ces IgHB ne confèrent qu'une protection transitoire et doivent être relayées par les anticorps induits par la vaccination.

1.6.3. Vaccination contre l'hépatite B

Les premiers essais cliniques de vaccination ont été réalisés dès 1976 en France puis en 1979 aux USA (**Maupas et al., 1976; Szmuness, 1979**). Ce vaccin était constitué de particules virales vides ne contenant que les protéines d'enveloppe, purifiées à partir de sérum de patients chroniquement infectés par le VHB. Ces vaccins dits plasmatiques,

étaient faits d'AgHBs présents dans le sérum concentrés et inactivés. Ils ont été autorisés à la mise sur le marché en 1981. Ils étaient, à la fois, très efficaces (plus de 90% des sujets protégés) et inoffensifs (30 millions des doses ont été utilisées sans troubles particuliers). Cependant la fabrication industrielle de ce vaccin posait des problèmes puisqu'il fallait éliminer des sérums toutes possibilités de contamination virale, ce qui la rendait longue et coûteuse. Par la suite, une nouvelle génération de vaccins a été produite par génie génétique en faisant exprimer par la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ou les cellules de mammifères (Chinese Hamster Ovary : CHO) les gènes codant les protéines d'enveloppe S ou PrS-S. Ces nouveaux vaccins sont actuellement les plus utilisés (Tiollais, 2001). On peut utiliser deux schémas vaccinaux : l'un à quatre injections, avec trois injections distantes de un mois et un rappel au bout d'un an (schéma 0-1-2-12); l'autre à trois injections seulement, avec deux injections distantes de un mois et un rappel à six mois (schéma 0-1-6). Il existe des vaccins monovalents contre l'hépatite B, les vaccins bivalents contre l'hépatite A et B et des vaccins hexavalents destinés aux nourrissons (diphtérie, tétanos, coqueluche acellulaire, poliomyélite, *Haemophilus influenzae* b et hépatite B). Pour les nouveau-nés de mères porteuses d'AgHBs, dont la recherche est obligatoire au 6^{ème} mois de grossesse dans les pays occidentaux, on pratique une sérovaccination. A la maternité, dans les 12 à 14 heures suivant la naissance, on administre en deux sites différents 100 UI d'immunoglobulines spécifiques anti-HBs et une première dose de vaccin.

La vaccination induit une immunité protectrice chez 95 à 98 % des vaccinés immunocompétents ; l'immunité humorale peut être vérifiée et quantifiée par dosage des anticorps anti-HBs (on considère classiquement qu'un titre supérieur à 10 UI/L est protecteur), mais une mémoire immunitaire permet de protéger le sujet répondeur même après disparition de ces anticorps circulants. L'efficacité de la vaccination est optimale

avant 25 ans mais il existe des facteurs exerçant une réponse négative sur la réponse à la vaccination. Parmi ceux-ci, on cite l'âge (l'immunogénicité diminue nettement après 40 ans), le sexe (les hommes répondent moins bien que les femmes), l'obésité, le tabagisme et le traitement par hémodialyse. L'immunité conférée est de longue durée : prouvée sur 10-15 ans, elle pourrait atteindre, voire dépasser 40 ans, d'après certaines modélisations. L'innocuité de ce vaccin est remarquable et sa mise en cause récente (en France) dans la survenue de cas de sclérose en plaque n'a pas de fondement scientifique (**Ascherio et al., 2001; Confavreux et al., 2001**).

Pour combattre l'extension de l'hépatite B humaine, les experts soulignent l'importance de la vaccination de trois cibles privilégiées pour assurer la protection optimale de la population : les sujets à risques (professionnels de santé et cela avant l'embauche, familles de porteurs chroniques du virus, toxicomanes par voie intraveineuse), les nouveau-nés de mère porteuse d'AgHBs. L'extension de la vaccination doit être appliquée à tous les nourrissons et proposée à tous les préadolescents (11–13 ans) avant l'âge des premiers rapports sexuels. La seule politique vaccinale permettant la lutte contre l'infection et son éventuelle éradication passe par une vaccination systématique de la population, de préférence avant la puberté.

1.6.4. Traitements curatifs

En dehors des hépatites fulminantes, les hépatites aiguës ne représentent pas de problèmes sérieux. En revanche, pour les patients atteints d'infection chronique, il faut diminuer les troubles hépatiques et freiner l'évolution en réduisant la charge virale. Le mécanisme de constitution des lésions au cours de l'hépatite virale chronique B est double, surtout lié à la réaction immunomédiée qui dépend elle-même de la réplication

virale. En conséquence, deux types de traitement sont susceptibles d'être efficaces : les immunomodulateurs et les molécules anti-virales.

1.6.4.1. But du traitement

Le principal but du traitement de l'hépatite virale chronique B est l'inhibition de la réplication virale, permettant l'amélioration, voire la guérison des lésions histologiques, au mieux avant l'installation d'une cirrhose, stade irréversible. L'arrêt de la réplication virale est attesté par la négativation de l'ADN viral dans le sérum, accompagnée d'une séroconversion dans le système « e » (disparition de l'AgHBe et apparition de l'anticorps anti-HBe) ; la séroconversion dans le système « s » (disparition de l'AgHBs, voire apparition des anticorps anti-HBs est plus rare et plus tardive) et la normalisation des transaminases et d'une amélioration histologique (**Lok et al., 2000**). Ainsi le traitement peut stopper l'évolution de l'infection et limiter sa diffusion par voie sanguine, sexuelle et materno-fœtale par l'arrêt de la production de virions. Mais l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule-hôte liée à la transcription inverse d'un ARN pré-génomique lors de la réplication de l'ADN du VHB explique la persistance du risque de carcinome hépato-cellulaire malgré l'arrêt de la réplication virale. Les porteurs sains ne justifient d'aucun traitement.

1.6.4.2. Immunomodulateurs

– Interféron-alpha (IFN α)

L'IFN α constitue aujourd'hui la base du traitement de première intention. L'IFN α , molécule physiologique de défense contre les virus, trouve une place de choix dans le

traitement des hépatites chroniques. En effet, il associe des propriétés antivirales, immunomodulatrices et antiprolifératives (**Korenman et al., 1991; Tiné et al., 1993; Niederau et al., 1996**). La première action de l'IFN α découle de la liaison de la molécule à des récepteurs membranaires spécifiques à la surface des cellules infectées. Cette fixation déclenche l'activation d'enzymes intracellulaires favorisant la traduction de diverses protéines qui rendront la cellule plus résistante aux infections virales : c'est ainsi qu'une augmentation de l'activité de la 2'5' oligoadénylate synthétase activera certaines ribonucléases telles que la LRNase qui est capable de détruire l'ARN messager viral ; l'activation d'une protéine kinase permettra l'arrêt de l'assemblage des ribosomes nécessaires à la synthèse des protéines virales. Quant à l'action immunomodulatrice de l'IFN α , complémentaire de l'action d'inhibition de la réplication virale, elle est pléiotrope. L'IFN α stimule l'expression des antigènes de l'hôte, tels que des molécules HLA de classe I, à la surface des cellules infectées. Parallèlement, l'IFN α favorise la maturation des cellules T cytotoxiques et l'activation des cellules NK ("natural killer").

A la dose de 5 millions d'unités par voie sous-cutanée 3 fois par semaine pendant 4 à 6 mois (**Perrillo et al., 1988**), il permet une négativation de l'ADN viral dans 37% des cas et une séroconversion dans le système « e » dans 33 % des cas, voire dans le système « s » dans 5 à 10% des cas, un an après l'arrêt du traitement (**Perrillo et al., 1990; Korenman et al., 1991**).

Son utilisation est limitée par l'existence de contre-indications (en particulier chez les patients transplantés en raison du risque de rejet) et d'effets secondaires : syndrome pseudo-grippal, asthénie, anorexie, amaigrissement, nausées, vomissements, sécheresse cutanéomuqueuse, syndrome dépressif, dysthyroïdies, neutro-thrombopénies. Dans la plupart des cas, ces effets secondaires sont modérés, contrôlés par la prise de traitements associés comme le paracétamol à doses adaptées, mais il est parfois nécessaire de

diminuer la posologie d'IFN α , voire d'arrêter le traitement. Les effets secondaires régressent à l'arrêt du traitement. Aussi une surveillance clinique mensuelle est nécessaire ainsi qu'une surveillance biologique (hémogramme et numération des plaquettes et les transaminases toutes les deux semaines, puis tous les mois). L'efficacité du traitement est jugée sur la recherche de l'ADN viral et les sérologies virales réalisées tous les trois mois. Les facteurs prédictifs de réponse à l'IFN α sont le caractère récent de l'infection (moins de deux ans), un dosage des transaminases supérieur à trois fois la normale et une réplication virale modérée. L'existence d'une co-infection par le VIH, une contamination materno-fœtale et la présence d'un virus mutant dans la région PréC (Ag HBe négatif, Ac HBe positif associés à une virémie positive) sont au contraire prédictives d'une mauvaise réponse à long terme à l'IFN α .

Après un traitement efficace, la survenue d'une réactivation doit être dépistée tous les six mois par la recherche de l'ADN viral et les sérologies virales. Le dépistage précoce d'un carcinome hépatocellulaire est assuré par une échographie et une mesure quadrimestrielle de l'alphafœtoprotéine. L'interféron a été récemment remis à l'honneur comme traitement de première ligne de l'infection chronique par le VHB au cours de la conférence européenne de consensus sur le VHB (**De Franchis et al., 2003**).

– Interféron pégylé ou Pegasys®

L'interféron pégylé est un interféron conjugué à du polyéthylène glycol (PEG), qui permet de retarder son élimination rénale et de prolonger la demi-vie du produit permettant ainsi l'administration en une seule injection sous-cutanée hebdomadaire (à raison de 180 μ g/semaine pour une durée de 48 semaines). Deux interférons pégylés, alpha-2a et alpha-2b, sont actuellement produits. Ils diffèrent essentiellement par la qualité et la quantité de PEG conjugué à l'interféron. Le PEG-IFN α -2a accroît les

chances de séroconversion HBe de 37% contre 25% avec l'IFN standard et il a montré une augmentation d'environ 10% de l'efficacité en terme de négativation de l'ADN viral du VHB (Marcellin et al., 2004 ; Janssen et al., 2005).

– Transfert passif de l'immunité antivirale B

Un transfert passif de l'immunité contre le VHB a été décrit dans des modèles animaux et humains : la perfusion d'une allogreffe de moelle HLA identique d'un donneur récemment immunisé par la vaccination contre le VHB à un receveur naïf pour le VHB permet l'acquisition d'une immunité efficace anti-HBs malgré la déplétion de la moelle en cellules T. Un tel transfert à des receveurs porteurs chroniques de l'antigène HBs avec multiplication virale permet d'arrêter celle-ci ; le risque (autre que ceux de l'allogreffe elle-même) est l'hépatite fulminante. Cette méthode élégante comporte cependant le risque (autre que celui de l'allogreffe elle-même) de la survenue d'une hépatite fulminante.

1.6.4.3. Analogues nucléosidiques

– Vidarabine (adénine 5'monophosphate)

La Vidarabine est un antiviral de la famille des nucléosides puriques qui agit en inhibant l'ADN polymérase. Elle a été le premier analogue nucléosidique, utilisé dans les années quatre-vingt (Degos et al., 1988; Fiume et al., 1988). Son efficacité primaire est comparable à celle de l'IFN α (40% de négativation de la virémie après un traitement par 10 mg/k/j pendant cinq jours puis, 5 mg/k/j pendant vingt-trois jours par voie intramusculaire). De plus, cette efficacité est limitée par des effets secondaires fréquents dominés par une atteinte neuro-musculaire (neuropathie périphérique) habituellement

régressive à l'arrêt du traitement mais parfois invalidante, en particulier en cas d'insuffisance hépatique ou rénale. Du fait de sa toxicité, la vidarabine n'est plus utilisée à l'heure actuelle.

– Inhibiteurs de la transcriptase inverse

Lamivudine ou Zeffix® (ou 3TC)

La lamivudine est un analogue nucléosidique de type cytosine qui inhibe la transcriptase inverse. La lamivudine a été développée initialement dans le traitement de l'infection par le VIH où elle est connue sous le nom d'Epivir, puis s'est révélée dans la dernière décennie avoir une activité antivirale contre le VHB à des concentrations moindres (**Benhamou et al., 1995; Liaw et al., 2004**). La lamivudine agit après avoir subi une triple phosphorylation par les enzymes cellulaires. Il s'insère dans la chaîne d'ADN en synthèse dont il bloque l'élongation.

La lamivudine présente l'avantage d'une administration par voie orale et d'un excellent profil de tolérance. Son efficacité est presque constante : dans 95% des cas environ, la réplication virale est inhibée après un à trois mois de 100 mg de lamivudine par jour par voie orale. Une séroconversion dans le système « e » est observée dans 16% des cas et dans le système « s » dans 0 à 9% des cas selon les études après un an de traitement. Une amélioration histologique survient dès le troisième mois de traitement avec une diminution de l'inflammation et de la fibrose dans environ 56% et 35% des cas respectivement (**Lai et al., 1997; Dienstag et al., 2003**). Les effets secondaires sont rares (15%) et se limitent à une augmentation asymptomatique de l'amylase et des enzymes musculaires.

Malheureusement, cette efficacité est transitoire avec une réactivation quelques semaines après l'arrêt du traitement. En effet, des échappements thérapeutiques (par

mutation du génome viral) ou des effets rebonds de la charge virale après la fin du traitement sont observés (**Zoulim, 2004**). En fonction des demi-vies et du renouvellement du virus et des hépatocytes infectés, la durée minimale de traitement susceptible d'éliminer le virus a été calculée à douze mois. En réalité, malgré des durées de traitement prolongées de plus d'un an, la réplication virale réapparaît à l'arrêt de la lamivudine, même après séroconversion AgHBe/Ac anti-HBe et négativation de la virémie; ceci s'explique probablement par l'existence de réservoirs extrahépatiques et de formes virales intranucléaires inaccessibles au traitement (ADN superenroulé). Au cours de traitements prolongés, des échappements apparaissent qui sont caractérisés par une ré-augmentation des transaminases, une virémie à nouveau détectable et parfois la réapparition de l'AgHBe si une séroconversion avait eu lieu. Le support génétique de cette résistance à la lamivudine est une mutation localisée au niveau du motif conservé YMDD (Tyr-Met-Asp-Asp) du domaine catalytique (domaine C) de l'ADN polymérase aboutissant à la substitution de la méthionine 204 en valine (YVDD) ou en Isoleucine (YIDD) (**Niesters et al., 1998**). La mutation la plus fréquente, M204V/I est constamment associée à deux autres mutations dites compensatoires (L180M et V173L) localisées au niveau du domaine B du site catalytique de l'ADN polymérase (Figure 21). En effet, les souches mutantes dans le motif YMDD ont une activité enzymatique et une réplication diminuées, nécessitant ces mutations compensatoires pour restaurer leurs capacités répliquatives. La moindre efficacité de la lamivudine sur les souches mutées serait due à une augmentation de la taille de la poche où se fixe la lamivudine, diminuant son affinité, et ainsi son efficacité. Deux facteurs de risque d'échappement ont été individualisés : une durée prolongée de traitement et une virémie pré-thérapeutique élevée. L'indication d'un traitement par lamivudine doit prendre en compte les risques de réactivation en cas d'arrêt du traitement et d'échappement en cas de traitement prolongé, avec la possibilité

dans les deux cas de formes sévères. Une réactivation peut être traitée une deuxième fois de façon efficace par la lamivudine.

Adefovir dipivoxyyl ou Hepséra®

Adéfovire dipivoxyyl, prodrogue d'adéfovire, est le premier analogue nucléotidique (9-(2-phosphonylméthoxyéthyl) adénine ou PME) à avoir été développé dans le traitement de l'hépatite chronique B. Après phosphorylation, il agit en inhibant la polymérase virale par compétition directe avec le substrat naturel (désoxyadénosine triphosphate) et, après incorporation dans l'ADN viral, provoque la terminaison de la chaîne d'ADN. Aujourd'hui, l'adéfovire constitue une alternative à la lamivudine (**Hadziyannis et al., 2003**). Il permet de diminuer la réplication du VHB à la posologie de 10 mg/j dans les quatre semaines suivant l'introduction du traitement et induit une importante séroconversion dans le système « e ». Son efficacité a été montrée tant chez l'immunocompétent que chez l'immunodéprimé, notamment co-infectés par le VIH en situation d'échappement à la lamivudine (**Xiong et al., 1998; Marcellin et al., 2003; Hadziyannis et al., 2005**). L'effet secondaire principal de l'adéfovire est une insuffisance rénale dans 20% des cas, limitant son utilisation dans toutes les situations de néphropathie. Le taux initial de résistance virale à l'adéfovire est très faible. L'adéfovire dipivoxyyl appartient à une famille chimique différente de la lamivudine, les mutations se font dans d'autres régions de la polymérase (domaines B et D). Deux sont maintenant bien connues : A181V et N236T (Figure 21). Ces mutations n'entraînent qu'une diminution peu importante de la sensibilité in vitro du médicament, possiblement la raison de l'homologie de l'adéfovire avec son substrat naturel. Ceci explique le faible pourcentage observé d'émergence des souches résistantes.

Ténofovire

Cet analogue nucléotidique de la guanidine, apparenté à l'Adéfovir, permet le contrôle de la multiplication virale avec une absence de mutation induite dans l'ADN polymérase et un risque, quoique rare, de néphrotoxicité tubulaire (**Lacombe et al., 2005**). Développé dans le traitement de l'infection à VIH, il apparaît comme un excellent candidat pour la co-infection virale VHB/VIH où il a montré une efficacité dans le contrôle de la multiplication des mutants d'échappement à la lamivudine (décroissance de - 4 U logs de la multiplication virale après 48 semaines de traitement). La dose utilisée est de 10 mg /jour, la dose de 30 mg/jour augmentant le risque d'insuffisance rénale. Du fait de sa supériorité antivirale, il est appelé à moyen terme à remplacer l'Adéfovir pour le traitement de l'hépatite B. Le taux d'apparition de résistance est très faible.

Entécavir ou Baraclude®

L'entécavir est un analogue structural de la guanosine nucléoside qui inhibe la transcriptase inverse *in vitro* et en culture cellulaire. Dans le modèle de la marmotte infectée par le WHBV l'entécavir a montré une inhibition spectaculaire de la réplication virale qui se traduit par une diminution de l'ADNccc intra-hépatique et une réduction significative du risque de CHC. Des essais cliniques de phase II et III ont conduit à une AMM aux USA et une AMM en Europe en Juillet 2006 sous le nom de Baraclude®. L'efficacité antivirale, l'amélioration biochimique, la séroconversion anti-HBe et l'amélioration histologique sont supérieures à ce qui est observé avec la lamivudine (**Chang et al., 2006; Lai et al., 2006**). Le profil de résistance est aussi satisfaisant que celui de l'Adéfovir puisqu'à 96 semaines de traitement des patients naïfs HBe (+) ou antiHBe (+). Le processus d'échappement à l'entécavir est lent et le mécanisme de résistance à cet antiviral s'avère plus complexe car plusieurs mutations seraient nécessaires à l'apparition des souches résistantes. Cependant, l'administration antérieure

de lamivudine et la présence concomitante dans le génome viral des mutations de résistance à la lamivudine accélèrent la survenue d'une résistance complète à l'entécavir par addition de mutations de type S202G/I dans le domaine C ou M250V dans le domaine D de l'ADN polymérase (Figure 21). Les résistances sont observées chez 6% des patients traités pour une résistance à la lamivudine après un an de traitement. Les posologies suggérées sont de 0,5 mg/j pour les patients naïfs et de 1 mg/j pour ceux ayant une résistance à la lamivudine.

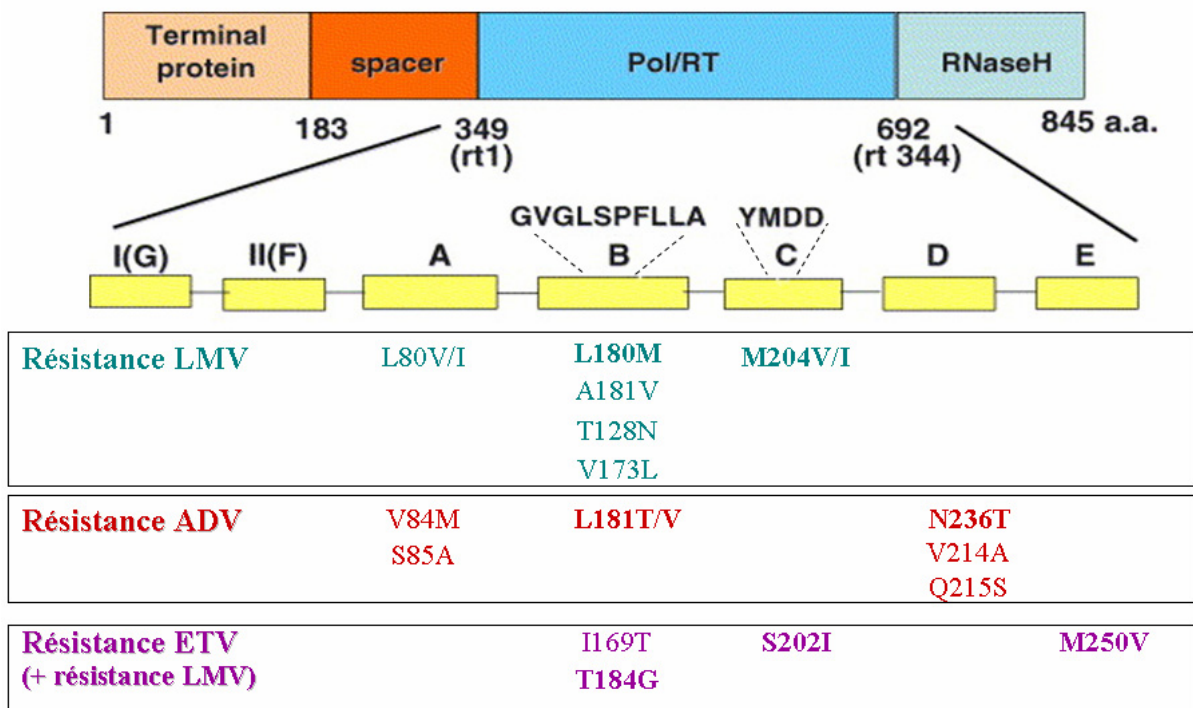


Figure 21: Positions des principales mutations de résistance aux antiviraux.

LMV = lamivudine; ADV = adéfovir; ETV = entécavir (D'après Gordien E : Cours Virus de l'hépatite B ; Actualités virologiques, Institut Pasteur, Paris. Mai 2006

– Autres analogues nucléosidiques

De nombreux autres analogues nucléosidiques sont en cours de développement. Par exemple l'emtricitabine (FTC), la clévodine (L-FMAU).

1.6.4.4. Associations thérapeutiques

L'efficacité partielle de la plupart des molécules et le risque de survenue d'échappement suggèrent, comme dans les infections par le VIH, que des associations thérapeutiques pourraient être bénéfiques pour le traitement de l'hépatite virale chronique B. Il peut s'agir d'une combinaison entre plusieurs analogues nucléosidiques ou de la combinaison entre analogues nucléosidiques et traitements immunomodulateurs.

L'association lamivudine- IFN α ne semble pas plus efficace que la lamivudine seule ou l'IFN α ne diminue pas le risque de réactivation après l'arrêt du traitement mais, réduit le risque de résistance virale aux analogues nucléosidiques comme la lamivudine. Une combinaison séquentielle plus que simultanée pourrait plus efficace (**Marcellin et al., 2004; Janssen et al., 2005**).

1.6.4.5. Vaccinothérapie

Plusieurs études pilotes ou ouvertes ont suggéré l'efficacité de la vaccinothérapie dans le traitement de l'hépatite chronique active, probablement expliquée par l'induction de réponse proliférative spécifique des antigènes vaccinaux. La vaccinothérapie consiste à injecter directement l'ADN codant des protéines virales, par voie intramusculaire. Bien que les résultats restent encore nuancés, ceci permet d'envisager un nouveau mode de protection en testant les effets synergiques d'une action des analogues de nucléosides avec une vaccinothérapie (**Schirmbeck et al., 1995**).

1.6.4.6. Autres stratégies antivirales

Une nouvelle approche a été proposée qui vise à inhiber la réplication du virus en agissant sur la traduction grâce à une stratégie d'oligonucléotides anti-sens ou d'ARN

interférant. Même si certains résultats sont prometteurs, d'importants obstacles restent à surmonter avant d'envisager une application clinique. Il faut en effet résoudre un premier problème, celui de faire pénétrer l'ARN interférant lui-même ou un plasmide d'expression à l'intérieur des cellules hépatiques (**Ren et al., 2006**).

1.6.4.7. Transplantation hépatique

Cette solution thérapeutique doit être envisagée chez les patients ayant une cirrhose sévère ou certaines formes de CHC (uni- ou pauci-focal, de petite taille, sans thrombose porte). Le risque principal est représenté par la réinfection du greffon. En effet, sous traitement immunosuppresseur, l'évolution vers la cirrhose et ses complications est plus fréquente et plus rapide. Des formes rapidement évolutives en quelques semaines et mortelles (fibrose hépatique cholestasiente) ont été décrites. L'administration d'immunoglobulines anti-HBs pendant la phase d'anhépathie, puis à vie, diminue le risque de réactivation d'environ 80 à 30%. Les récurrences sur greffon sont plus fréquentes s'il existe toujours une répllication virale au moment de la transplantation. La lamivudine peut être utilisée de façon efficace chez les patients ayant une réinfection, mais des cas d'échappements peuvent apparaître dès le sixième mois de traitement.

1.5. VIRUS DE L'HEPATITE DELTA (VHD) OU AGENT DELTA

L'antigène Delta (AgHD) a été découvert en 1977 en Italie par Mario Rizzetto dans le noyau des hépatocytes de patients atteints d'hépatite B chronique sévère (**Rizzetto et al., 1977 ; Rizzetto et al., 1980**). Des anticorps réagissaient avec l'AgHD, distinctivement des AgHBs, AgHBc et AgHBe du VHB. La transmission expérimentale de l'agent

infectieux au chimpanzé et la purification d'ARN associé à l'AgHD indiquaient l'existence d'un nouveau agent infectieux distinct du VHB. Il a été appelé agent Delta puis virus de l'hépatite Delta ou VHD.

1.5.1. Caractéristiques du virus

1.5.1.1. Structure

Le VHD est un petit virus de 36-37 nm de diamètre. Son enveloppe est formée de membranes lipidiques où sont ancrées les glycoprotéines du VHB qui portent l'AgHBs. Une structure organisée en ribonucléoprotéine d'un diamètre de 19 nm s'observe en microscopie électronique. Ainsi, la particule virale a une structure de chimère : l'enveloppe dérivée du VHB renferme deux constituants spécifiques du VHD : le génome et les protéines delta.

1.7.1.2. Génome

Le génome du VHD est un ARN circulaire simple brin de polarité négative, dont la longueur varie entre 1679 et 1683 nucléotides. C'est le plus petit génome de virus connu infectant les mammifères. Avec un pourcentage en GC de 60%, environ 70% des nucléotides s'apparient pour former une structure secondaire linéaire en pseudo double brin. Cette molécule ressemble à l'ARN infectieux des viroïdes des plantes mais, en diffère par sa longueur et sa capacité de coder une protéine dont il existe deux formes. Le génome du VHD est donc constitué de deux domaines : le domaine viroïde et la région codante. L'information génétique est transcrite en ARNm de petite taille (800 nt) complémentaire de l'ARN génomique.

1.7.1.3. Variabilité génétique du virus

Il existe entre différents isolats une divergence nucléotidique de 14 à 37%. Ainsi, 3 génotypes distincts de VHD ont été définis par une identité nucléotidique supérieure à 65%. Le génotype I est ubiquitaire (Italie, France, USA, Moyen Orient...) et la similarité en nucléotides au sein de ce génotype est de plus de 85%. Les isolats asiatiques (Japon, Taiwan) représentent un deuxième groupe dénommé génotype II, ayant une similarité en nucléotides de 75% avec le génotype I. Le génotype III, décrit en Amérique du Sud (Pérou, Colombie) au cours des hépatites sévères en association avec le VHB de génotype F, a un degré de similarité de 65,5% avec le génome du VHD de génotype I. Chez un sujet infecté, l'analyse à un temps donné montre une population hétérogène de molécules d'ARN. Au cours des infections chroniques apparaissent des mutations ou des délétions (le taux de mutation par nucléotide et par an est de $1,14 \times 10^{-3}$ à $1,28 \times 10^{-3}$) et plusieurs souches virales peuvent co-exister (quasi-espèces).

1.7.1.4. Protéines virales

Les deux protéines virales de 24 et 27 kDa s'associent dans la particule virale à l'ARN génomique. Elles portent l'antigénicité Delta (AgHD). Cet AgHD peut être détecté dans le foie ou le sérum de patients ou d'animaux infectés (chimpanzé ou marmotte). Les études en immunofluorescence ont permis de visualiser une fluorescence nucléaire, granulaire, intense dans les nucléoles. La petite protéine (sHD : 24 kDa ; 195 aa) active la réplication alors que la grande protéine (LHD : 27 kDa ; 214 aa) la réprime et joue un rôle dans l'assemblage des particules virales.

1.7.1.5. Multiplication

Le VHD se transmet exclusivement dans le cadre d'une infection par le VHB. En effet, l'AgHBs du VHB est indispensable au cycle du VHD : d'où le terme de virus satellite. Dans l'espèce humaine, le VHD se multiplie dans le foie. Il est également transmissible expérimentalement au chimpanzé infecté par le ChHVB et à la marmotte infectée par le WHBV. Le cycle de réplication très complexe ne nécessite pas la présence du VHB pour la réplication de l'ARN Delta. Par contre, l'infection par le VHD inhibe la réplication du VHB. Outre la compétition pour les protéines d'enveloppe du VHB, la petite protéine HD inhiberait la transcription des ARN du VHB.

1.7.2. Epidémiologie

L'infection par le VHD est liée à l'infection par le VHB. L'épidémiologie et les modes de contamination des deux virus se superposent donc en partie. On estime globalement à 5% la proportion de porteurs d'AgHBs infectée par le VHD. Cependant, des disparités de prévalence géographique existent.

Dans les pays occidentaux (Europe de Nord et de l'Ouest et les USA) où l'infection chronique par le VHB est inférieure à 0,5%, l'infection par le VHD s'acquiert par voie parentérale au sein des groupes à risque (usagers de drogues par voie IV). Elle est exceptionnelle en Europe du Nord mais sur le pourtour méditerranéen (Italie du Sud, Grèce et Moyen-Orient), le portage chronique du VHB varie de 1 à 5% et l'infection par le VHD est fréquente. La transmission s'effectue par contact familial ou sexuel. Dans les zones de forte endémie (Afrique Sub-saharienne), l'infection par le VHD se traduit par

des épidémies explosives. La transmission du VHD augmente avec la promiscuité et la surpopulation. Cependant, la transmission périnatale du VHD est faible, liée en partie par l'inhibition de la réplication du VHB par le VHD. La transmission semble donc se faire sur un mode intrafamiliale dans la petite enfance ou par la voie sexuelle. En revanche, le VHD est peu répandu dans le Sud-Est asiatique malgré la très forte prévalence de l'infection par le VHB.

1.7.3. Pouvoir pathogène

Le VHD étant un virus satellite du VHB, l'infection ne se développe que chez des patients également infectés par le VHB soit lors d'une co-infection soit par surinfection.

1.7.3.1. Co-infection

La co-infection est à l'origine d'une hépatite aiguë. Deux pics d'élévation du taux des transaminases, séparés de 2 à 5 semaines, s'observent dans 10 à 20% des co-infections, reflets probables des différentes cinétiques de réplication virale. Au début de la maladie, l'AgHD n'est pas toujours détecté car l'antigénémie est très fugace. Les IgM anti-HD prédominent (Tableau V). La co-infection est souvent caractérisée par une sévérité accrue de l'hépatite aiguë. Ainsi, des épidémies d'hépatites fulminantes ont été décrites chez les indiens en Amérique du Sud en 1981 et en République Centrafricaine en 1992. Elles s'associent à une infiltration graisseuse microvésiculaire, une nécrose des hépatocytes (**Andrade et al., 1992**). L'évolution est souvent marquée par une résolution de l'hépatite après la phase aiguë et, à l'image de l'histoire naturelle du VHB, seuls 5% des patients co-infectés évoluent vers la chronicité.

1.7.3.2. Surinfection

Au cours d'une surinfection, la multiplication du VHD est massive et les lésions hépatiques sont sévères. Il se développe une hépatite aiguë symptomatique chez 50 à 70% des patients. La surinfection entraîne fréquemment une hépatite chronique active qui évolue dans 60 à 70% des cas vers la cirrhose en 2 à 6 ans. Au début de la surinfection, la détection de l'AgHD est rapidement suivie par l'apparition des anticorps qui persistent à des taux élevés. Les IgG anti-HD persistent indéfiniment, tandis que les IgM anti-HD ne persistent que lors des hépatites chroniques à l'opposé des modèles classiques d'infection virale (Tableau V).

Tableau V : Evolution des marqueurs B et delta au cours des co-infections et des surinfections

Marqueurs	Evolution de l'infection à VHD			
	Phase aiguë		Chronicité	Guérison
	Co-infection	Surinfection		
AgHBs	±	+	+	-
IgM anti-HBc	+	-	-	-
AgHD	±	±	-	-
IgM anti-HD	±	+	±	-
ARN HDV	±	+	+	-
AgHD intrahépatique	+	+	+	-

1.7.3.3. VHD et carcinome hépatocellulaire

L'infection par le VHD entraîne des cirrhoses et s'associe à un développement précoce du cancer de foie (**Mammette, 2002**). Une forte prolifération cellulaire associée

à l'hépatite chronique D suggère un potentiel oncogénique direct du VHD. Une surexpression de l'oncogène cellulaire c-myc qui a été évoquée reste controversée.

1.7.4. Diagnostic virologique de l'hépatite delta

Chez un sujet AgHBs positif, le diagnostic biologique associe la caractérisation des marqueurs du VHD et du VHB. En l'absence d'information antérieure, co-infection et surinfection ne se différencient pas cliniquement. Les différents marqueurs de l'infection à VHD ont pour but de différencier une co-infection d'une surinfection, de suivre l'évolution de la maladie vers la guérison ou la chronicité, de décider la mise sous traitement du malade et enfin d'évaluer l'efficacité du traitement.

1.7.4.1. Diagnostic direct

– La recherche de l'AgHD a d'abord été réalisée par immunofluorescence directe sur coupes histologiques de foie après une biopsie, ce qui limite l'indication de cet examen. L'AgHD peut être aussi recherché dans le sérum par ELISA. Un agent dissociant expose l'AgHD inclus dans l'enveloppe de virus portant l'AgHBs. Cependant, l'antigénémie HD est précoce et fugace et de plus, la présence d'anticorps anti-HD dans le sérum du malade peut gêner la détection de l'AgHD.

– L'ARN du VHD peut être détecté et éventuellement quantifié dans le sérum, soit par des techniques d'hybridation au moyen de sondes spécifiques (ARN ou ADN complémentaires), soit par amplification génique. Les techniques d'amplification par RT-PCR (Reverse Transcriptase -*Polymerase Chain Reaction*) et PCR en temps réel du génome viral sont les plus sensibles. La structure secondaire de l'ARN du VHD doit être dénaturée, puis rétro-transcrite par une transcriptase inverse avant l'amplification. Les amorces utilisées pour l'amplification sont complémentaires des régions conservées du

génomique (ribozymes et gène HD) et leur choix repose sur l'épidémiologie locale des génotypes.

1.7.4.2. Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect de l'infection par le VHD repose sur la recherche des IgM anti-HD et des IgG anti-HD dans le sérum. Les plus couramment utilisées sont les techniques immuno-enzymatiques, par immunocapture pour les IgM et par compétition entre les anticorps de référence et les anticorps totaux dans le sérum du patient. Jusqu'à présent, les techniques ELISA utilisaient de l'AgHD provenant du sérum ou de foie de patients ou d'animaux infectés par le VHD. Actuellement, les nouveaux tests utilisent des AgHD recombinants ou des peptides de synthèse.

1.7.5. Traitement et prévention de l'hépatite delta

A l'heure actuelle, aucun traitement n'est recommandé pour le traitement de l'hépatite delta aiguë.

En ce qui concerne le traitement de l'hépatite delta chronique, les résultats sont décevants. Le seul traitement qui ait montré une certaine efficacité est l'IFN- α (**Farci et al., 1994**). Les premières études ont montré une efficacité transitoire variant de 0 à 60% en ce qui concerne la normalisation des transaminases, associée à une diminution de l'ARN-VHD et de l'AgHD dans le sérum et dans le foie, bien que l'AgHBs et les anticorps anti-HD restent présents dans le foie. Cependant, le bénéfice était transitoire et disparaissait après l'arrêt du traitement. Par la suite, des études contrôlées et randomisées ont montré qu'un traitement prolongé (48 semaines) et à haute dose (9 millions d'unités 3

fois par semaine) par l'IFN- α , permettait d'augmenter significativement la survie de ces patients (**Farci et al., 2004**). Dans ces études, la normalisation prolongée des transaminases sous IFN- α corrélait avec l'amélioration des fonctions hépatiques, la disparition des IgM anti-HD et la diminution de la charge virale delta. Dans la plus part des études, le taux de rechute est proche de 100% après l'arrêt du traitement.

L'addition de la lamivudine aux fortes doses d' l'IFN- α n'améliore pas le taux de réponses prolongées (**Lau et al., 1999**). Le PEG-IFN pourrait représenter une bonne option thérapeutique pour les traitements au long cours.

A l'heure actuelle, la transplantation hépatique offre la meilleure option pour les hépatites virales delta évoluées, avec un risque de réinfection du greffon beaucoup plus faible que dans les cas de mono-infection par le VHB.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1. MATERIEL UTILISE POUR LES ETUDES MOLECULAIRES

Le VHB étant un pathogène de classe 3, toutes les manipulations de sérums avant l'extraction de l'ADN viral ont été réalisées dans un poste de sécurité microbiologique de classe 2 et tous les déchets contaminés ont été éliminés selon la procédure en vigueur dans les laboratoires. Le port de gants à usage unique est obligatoire.

2.1.1. Produits chimiques et tampons

- Trousse d'extraction sur l'automate m1000 : Abbott *m* Sample Preparation System_{DNA}, commercialisé par Progema, Charbonnières-les-bains, France
- Trousse d'extraction, QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Courtabouef, France
- Trousse de purification, Wizard® PCR Preps, Promega, Charbonnières-les-bains, France
- Trousse pour PCR quantitative : Real Time™ HBV PCR Kit, Laboratoires Abbott, Rungis, France
- Trousse pour le clonage : TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen Life technologies, Cergy Pontoise, France
- Trousse de séquençage : ABI PRISM® Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Courtabouef, France
- dNTP Set [dATP, dTTP, dCTP, dGTP] 100 mM solution, Invitrogen Life technologies, Cergy Pontoise, France

- Taq DNA polymerase 5 U/μL Native, Invitrogen, Life technologies, Cergy Pontoise, France

- 50 mM MgCl₂, Invitrogen, Life technologies, Cergy Pontoise, France

- 100 Base pair Ladder, Invitrogen, Life technologies, Cergy Pontoise, France

- Acétate de sodium 3 M, pH = 5,6 - CHU Nancy, Laboratoire Central de Biochimie

- Ethanol à 95%, Merck Kga, Darmstadt, Allemagne

- Isopropanol ≥ 99%, Sigma-Aldrich, France

- EDTA (Ethylene–Diamine–Tetra–Acetic acid) à 125 mM, CHU Nancy, Laboratoire Central de Biochimie

- Tampon Borate EDTA pH = 8,0- CHU Nancy, Laboratoire Central de Biochimie

- Agarose USB corporation, Cleveland, USA

- Bromure d'éthidium (BET), Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

- Bleu de depot : 10X BlueJuice[®] Gel Loading Buffer, Invitrogen, Life technologies, Cergy Pontoise, France

2.1.2. Appareillage

- Extracteur automatique : Abbott m1000TM, Laboratoires Abbott, Rungis, France

- Thermocycleur : Gene Amp PCR System 2400, Applied Biosystems, Courtabouef, France

- Thermocycleur: Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, Courtabouef, France

- Appareil de détection PCR en temps réel : ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (SDS), Applied Biosystems, Courtabouef, France
- Séquenceur automatique ABI PRISM[®] 3100 – Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Courtabouef, France
- Centrifugeuse réfrigérée : Allegra[™] 64 R Centrifuge, Beckman, Coulter
- Spectrophotomètre : Gene Quant, Pharmacia Biotech, Cambridge
- Micro-onde : Micro-Chef FM 2935, 900w, Moulinex
- Migration : Générateur BioRad Power PAC 3000, BioRad, Marnes le Coquette, France
- Lampe UV : BIOBLOCK Scientific, 67403 Illkirch Cedex
- Photographie de gel : High Performance CCD Imaging System[™], Appligene
- Pompe à vide : DNA Speed VAC, DNA 110, Savant
- Séquenceur automatique : ABI PRISM[®] 3100 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Courtabouef, France

2.1.3. Petit matériel

- Pipettes de 1, 2, 5, 10 mL Falcon[®], Becton Dickinson, le Pont De Claix, France
- Pipettes automatiques de 10, 20, 100, et 1000 µL, Gilson, Roissy, France
- Cônes stériles avec filtre, ART
- Micro-cuves en quartz pour le dosage spectrophotométrique, Pharmacia Biotech, Cambridge

- Microtubes pour PCR : MicroAmp[®], Applied Biosystems, Courtabouef, France
- Tubes polypropylène fond conique 15 mL BLEU MAX[®] Jr, Becton Dickinson Drogheda, Ireland
- Tubes polypropylène fond conique 50 mL BLEU MAX[®], Becton Dickinson Drogheda, Ireland
- Tubes eppendorf 1,5 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Allemagne

2.1.4. Amorces pour les PCR

Les oligonucléotides ont été synthétisés et purifiés par le Service Commun de Biologie Moléculaire du CHU de Nancy (Tableau V) (Mme Monhoven). Ils ont été repris dans du tampon Tris 10 mM ; EDTA 1 mM (PH 8).

2.1.4.1. Au laboratoire de virologie de Nancy

La séquence complète du gène *préS/S* a été amplifiée avec les amorces « externes » 2810 (sens) et 979 (antisens) définies par Bowyer et ses collaborateurs (**Bowyer et al., 1997**) pour la production d'un fragment de 1,4 kb. Une série de PCR nichée a été réalisée avec un jeu d'amorces «internes» pour amplifier la région 3' du gène *pré-S1*, le gène *pré-S2* et le gène *S* (**Odemuyiwa et al., 2001**) (Tableau V).

2.1.4.2. Au laboratoire National de Santé de Luxembourg

Les séquences permettant l'amplification des gènes *préS*, *S*, *C*, et *X*, sont celles définies par **Olinger et al., (2006)** à partir de la séquence du génome de la souche de

référence du génotype E X75657, disponible dans GenBank (**Kao et al., 2002**) (Tableau V).

2.1.4.3. Au laboratoire des Hépatites virales à l'Institut Pasteur de Bangui

Les séquences des amorces permettant l'amplification du gène X, ont été définies au laboratoire de virologie de Nancy à partir de la séquence du génome de la souche de référence du génotype E X75657 (Tableau V).

Tableau VI : Séquences des amorces utilisées pour les PCR nichées et les PCR de séquençage

	Round	Amorce	Séquence des bases (5' - 3')	Position (nt)
Couples d'amorces région <i>prés-S</i> : PCR nichée				
Bowyer et al., 1997	1	2810	CAC GTA GCG CCT CAT TTT CTG GGT CAC CTT	2794-2928
		979	ATT CT CAA AAG ACC CAC AAT TCT TTG ACA TAC TTT CCA AT	977-1010
Odemuyiwa et al., 2001	2	PF PR	ACA TTC CAC CAA GCT CTG CA AGG TTC CTT GAG CAA GAG	8-27 531-547
	2	PreS2-F PreS-R	CAA CAA GGT AGG AGT GGG AGC AT TCA ACA AGA AAA ACC CCG CCT GT	3009-3031 199-221
	2	S-F S-R	GTG TCT TGG CCA AAA TTC GCA GT GGA AGA TGA TAA AAC GCC GCA GAC	295-317 381- 404
Couple d'amorces pour le gène <i>pré-S</i> : PCR semi-nichée				
Olinger et al., 2006	1	2422-F PreS-R	AGA ACT CCC TCG CCT CGC AGA C ACA GGC GGC GTT TTT CTT GTT GA	2375-2496 199-222
	2	2451-F PreS-R	TCA ATC GCC GCG TCG CAG AA ACA GGC GGC GTT TTT CTT GTT GA	2404-2423 199-222
Couple d'amorces pour le gène <i>S</i> : PCR semi-nichée				
Définies et utilisées à l'IPB	PCR classique	S2 HBV-F S1 HBV-R	CAT CTT CTT GTT GGT TCT TCT G TTA GGC TTT AAA TGT ATA CCC	427-448 822-842

Couple d'amorces pour le gène S : PCR semi-nichée				
Olinger et al., 2006	1	P2-F 979'-R	CCT GCT GGT GGC TCC AGT TC ATT GGA AAG TAT GTC AAA GAA TTG TGG GTC TTT TG	56-75 977-1001
	2	P2-F Mac-RV2	CCT GCT GGT GGC TCC AGT TC TGG AAG TTG GGG ATC ATT GCC	56-75 892-911
Couple d'amorces pour le gène X : PCR semi-nichée				
Olinger et al., 2006	1	455-F 1800-R	CAA GGT ATG TTG CCC GTT T TAG GAG GCT GTA GGC ATA AAT TGG TCT	455-473 1771-1800
	2	696-F 1800-R	TCA GTG GTT CGT AGG GCT TTC C TAG GAG GCT GTA GGC ATA AAT TGG TCT	694-715 1771-1800
Définies et utilisées à l'IPB	PCR classique	X2-F X1-R	CTG GAT CCT GCG GAC GTC CTT GTT CAC GGT GGT CTC CAT	1398-1421 1608-1625
Couple d'amorces pour le gène C : PCR semi-nichée				
Olinger et al., 2006	1	1608-F 2661-R	GCA TGG AGA CCA CCG TGA ACG CAA TTT GTA GGT CCT CTA ACA GTA AAT GAA	1606-1626 2615-2586
	2	1644-F 2661-R	TGC CCA AGG TCT TAC ATA ATA GGA CTC TTG CAA TTT GTA GGT CCT CTA ACA GTA AAT GAA	1639-1668 2586-2615
Définies et utilisées à l'IPB	PCR classique	C2 -F C1 -R	ACT GTT CAA GCC TCC AAG CT AGT GCG AAT CCA CAC TC	1859-1878 2268-2284

2.2. MATERIEL UTILISE POUR LE PRELEVEMENT DES PATIENTS

2.2.1. Matériel de prélèvement sanguin

- Aiguilles pour prélèvement sanguin
- Corps Vacutainer®
- Tubes secs de 5 mL
- Tubes citratés de 5 mL
- Gants stériles à usage unique

2.2.2. Matériel et produits utilisés pour la réalisation de la cytoponction

- Aiguille à ponction lombaire de 22 ou 23 gauge
- Lames porte-objet
- Compresses stériles et Sparadrap
- Flacon de lidocaïne à 2%
- Alcool à 90°C
- Betadine dermique 10%
- Cryotubes pour la conservation (Nunc®)

2.2.3. Echographie

Echographe de marque ALOKA SSD – 1400 muni d'une sonde de 3,5 et 7,5 MHz

2.3. METHODES

Deux populations ont été étudiées, la première pour la détermination des génotypes des souches de virus de l'hépatite B de patients centrafricains par séquençage ; et la deuxième dans le cadre d'une étude clinique et biologique de patients hospitalisés pour une suspicion de carcinome hépatocellulaire.

2.3.1. Première population

2.3.1.1. Cadre d'étude

La présente étude a été réalisée par l'Institut Pasteur de Bangui (IPB), où une partie des examens biologiques des patients a été réalisée dans le laboratoire d'analyses médicales, et a mis en contribution :

- le « service d'hépatogastro-entérologie » de l'hôpital de l'Amitié de Bangui pour le recrutement et l'inclusion des patients
- le « laboratoire de virologie » du CHU de Nancy pour la recherche sérologique des marqueurs du VHB, la mesure de la charge virale et la caractérisation moléculaire par séquençage des souches du VHB (gène préS/S), l'analyse phylogénétique des séquences complètes de 29 souches du VHB
- le « Département d'Immunologie » du Laboratoire National de Santé de Luxembourg pour le génotypage et l'analyse phylogénétique des séquences complètes et/ou partielles des souches et l'étude des souches «particulières».

2.3.1.2. Patients

Les échantillons ont été collectés, entre Février et Septembre 2004, de 112 hommes et de 84 femmes admis avec des symptômes d'hépatite aiguë ou chronique, dans le service de gastro-entérologie de l'Hôpital de l'Amitié de Bangui. Bangui, capitale de la RCA étendue sur une superficie de 66 km², est la ville la plus importante avec une population estimée à 737694 habitants en 2003 (**Bureau de Recensement Central Bangui, 2003**). La plupart des patients sont venus de l'intérieur même de la ville de Bangui sur un rayon de 50 km (secteur où les mouvements de population sont les plus importants), et quelques autres sont venus directement des provinces de l'Est et de l'Ouest du pays, éloignées d'environ 500 km de la capitale.

Pour participer à l'étude, un consentement éclairé et signé a été demandé aux patients ou à leur proche. Dès l'inclusion du patient dans l'étude, un dossier clinique standardisé a été rempli par le médecin du service, comprenant l'identification du patient, les caractéristiques sociodémographiques, les antécédents médicaux, et les signes cliniques (ictère, vomissements, hépatomégalie, oedèmes des membres inférieurs) à l'admission.

Deux prélèvements sanguins ont été réalisés sur deux tubes secs de 5 mL, dont l'un a été utilisé pour la recherche des marqueurs du VHB, pour le dosage des transaminases (ALAT et ASAT), et le deuxième a été réservé pour les études moléculaires complémentaires. Pour les études moléculaires, tous les sérums ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.3.1.3. Sérologie

La recherche des marqueurs du VHB (Ag-HBs, anticorps anti-HBs, Ig totaux anti-HBc) a été réalisée sur l'automate Architect (Laboratoires Abbott, Rungis, France) qui utilise la technique de dosage immunologique microparticulaire par chimioluminescence (CMIA).

2.3.1.4. Détermination de la charge virale

L'ADN du VHB a été quantifié par la technique de PCR en temps réel selon la méthode Taq Man avec la trousse prête à l'emploi «HBV PCR kit» (Laboratoire Abbott, Rungis, France) sur l'ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems). L'HBV Master contenait les réactifs et les enzymes nécessaires à l'amplification spécifique d'une séquence hautement conservée de 134 pb du gène de la capside (core) du VHB, représentant tous les génotypes de A à H. Une sonde spécifique doublement marquée par un émetteur (le fluorochrome FAM) en 5' et un extincteur (TAMRA) en 3' a été ajoutée au mélange. Ce double marquage rend impossible toute élongation à partir de la sonde. Lorsque l'émetteur et l'extincteur sont à proximité, aucune fluorescence n'est mesurée. Lors de l'amplification, la polymérase (par son activité exonucléasique 5'3') digère la sonde et le fluorochrome est alors libéré. Cette fluorescence, proportionnelle au nombre de copies amplifiées, a été mesurée dans l'ABI PRISM[®] 7000 SDS (seuil de détection =

29 (± 3) copies/mL ; avec les extrêmes variant de 29 à $2,10^{10}$ copies/mL. Les échantillons pour lesquels un résultat positif a été noté mais avec une charge virale inférieure à 29 copies/mL était considérée comme détectables mais pas quantifiables.

2.3.1.5. Extraction de l'ADN viral

L'extraction de l'ADN viral a été réalisée selon la méthode Qiagen (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Courtabouef, France). Le sérum est lysé dans des conditions de dénaturation par le tampon AL reconstitué avec de l'éthanol absolu en présence de la protéinase K. Les lysats ont été ensuite déposés dans la colonne contenant un gel de silice. Après centrifugation, la colonne a été lavée avec deux tampons (AW1 et AW2). L'ADN a été ensuite élué dans un tampon approprié (AE) et conservé à -20°C pour la réalisation des PCR.

Après comparaison des résultats obtenus avec la trousse QIAamp® DNA Blood Mini Kit, et l'automate m1000™ (Laboratoires Abbott) les rendements étaient comparables, aussi la méthode d'extraction Qiagen, plus simple à mettre en oeuvre, rapide et moins coûteuse, a été retenue.

2.3.1.6. Amplifications géniques et purification des amplicons

– Au laboratoire de virologie de Nancy

La séquence complète du gène *préS/S* a été amplifiée avec les amorces «externes» 2810 (sens) et 979 (antisens) publiées par Bowyer et ses collaborateurs (**Bowyer et al., 1997**) pour générer un grand fragment de 1,4 kb (Tableau V). Ensuite, une série de PCR nichées a été réalisée avec un jeu d'amorces «internes» définies par Odemuyiwa (**Odemuyiwa et al., 2001**) pour amplifier la région 3' du gène *pré-S1*, le gène *pré-S2* et le gène *S* (Figure 22).

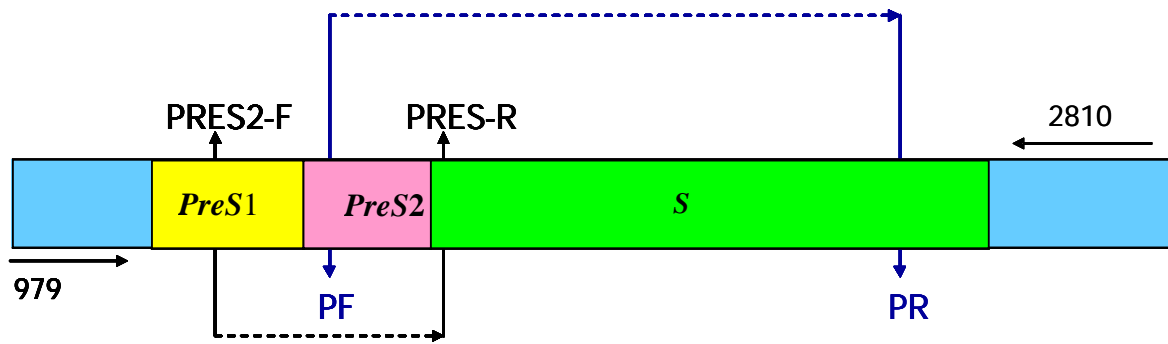


Figure 22 : Schéma de la région Prés/S étudiée

En pratique, pour la première PCR, le mélange réactionnel était composé de tampon PCR 1X, 10,0 pM de chaque amorce sens (2810) et antisens (979), 10,0 mM de chaque dNTP, 1,8 mM de MgCl₂, 1 unité de Taq DNA polymérase, de l'eau distillée et 5 µL d'ADN pour l'amplification du fragment de 1,4 kb; dans un volume final de 50 µL. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 5 min de dénaturation à 95°C suivie de 30 cycles d'une min à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 50°C, et 1 min d'élongation à 72°C et enfin un cycle d'élongation finale de 10 min à 72°C.

Pour la réalisation des PCR nichées, 5 µL des produits d'amplification de la première PCR ont été repris dans un volume réactionnel final de 50,0 µL. Les produits de PCR ont été préparés et amplifiés dans les mêmes conditions. Les amplicons ont été ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose et détectés aux UV grâce à l'incorporation du BET (contenu dans le gel) entre les bases de l'ADN.

Deux méthodes de purification des produits de PCR ont été testées : la purification par la trousse Wizard (Wizard® PCR Preps DNA Purification System, Promega) et la purification par précipitation de l'ADN à l'éthanol, en présence d'acétate de sodium 3M et de l'EDTA 125 mM préparés dans le laboratoire Central de Biochimie du CHU de

Nancy. Les rendements étant nettement meilleurs avec la technique de précipitation (moins coûteuse et rapide), elle a donc été retenue.

– Au laboratoire National de Santé au Luxembourg

Le génome complet des VHB a été séquencé avec les couples d'amorces définies par Olinger et ses collaborateurs (**Olinger et al., 2006**). Très brièvement, les quatre ORF (S, X, C, Pré-S) ont été amplifiés avec quatre couples d'amorces (Tableau V) à raison de deux « rounds ou PCR » par couple (PCR nichée ou semi-nichée). Toutes les PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µL avec : le tampon PCR 1X, 200 nM de dNTPs, 200 nM de chaque amorce sens et antisens, du MgCl₂ à des concentrations variables, 1 unité de la Taq DNA polymérase et 5 µL d'échantillon d'ADN. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 5 min de dénaturation à 95°C suivie de 40 cycles (pour les premières PCR ou « round 1 » et 30 cycles pour les PCR nichées ou semi-nichées ou « round 2 ») de 20 secondes (s) à 95°C, 20 s d'hybridation à des températures variables (0,3°C/s) et 90 s d'élongation à 72°C (**Olinger et al., 2006**). Les produits de PCR ont été purifiés sur des mini-colonnes de chelex (Qiagen PCR kit, Qiagen, France) et élués dans de l'eau distillée.

2.3.1.7. Séquençage

Après le dosage spectrophotométrique, 10 à 30 ng d'ADN purifié ont été utilisés dans la réaction de PCR de séquençage basée sur la technique de terminaison aléatoire de chaînes avec la trousse ABI PRISM® Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing, Applied Biosystems. Ils ont été séquencés dans les deux directions en utilisant le même jeu d'amorces utilisées pour les PCR nichées. Le milieu réactionnel contenait : 2,0 µL de Ready Reaction Premix 2,5X ; 1,0 µL tampon sequencing 5X (BigDye Terminator

V1.1/V3.1) ; 3,2 pmol d'amorce, 10 à 30 ng de matrice et de l'eau bi-distillée. Ce mélange a été soumis à 25 cycles d'amplification de 10 s à 96°C (dénaturation) , 5 s à 50°C (hybridation) et 4 min à 72°C (élongation) dans un thermocycleur (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems). Les produits amplifiés ont été purifiés par précipitation avec l'acétate de sodium 3,0 M ; EDTA 125,0 mM, pH = 5,6 et éthanol 95% (v/v), puis le culot d'ADN a été évaporé à l'aide d'une centrifugation à vide (Speed VAC™). Les séquences nucléotidiques ont ensuite été déterminées avec le séquenceur ABI PRISM® 3100 - Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.3.1.8. Clonage

Les échantillons qui présentaient plusieurs nucléotides mixtes ont été analysés ultérieurement (dans le Département d'Immunologie au laboratoire National de Santé au Luxembourg) par clonage des fragments PréC/C, PréS et S dans des vecteurs plasmidiques pCR4-TOPO (Trousse TOPO TA Cloning, Invitrogen). L'intérêt de cette trousse est de fournir un vecteur comprenant les séquences d'ADN du bactériophage M13 introduites de part et d'autre site de ligation, permettant ainsi l'amplification et le séquençage en entier des inserts en utilisant des « amorces universelles M13 » commercialisées. De plus ce vecteur présente des T (thymine) aux extrémités 3', ce qui permet une ligation directe des produits de PCR en 5 min. Ces vecteurs ont ensuite été utilisés pour la transformation d'*E. coli* rendues compétentes par électroporation. Ces vecteurs possèdent un gène de résistance à l'ampicilline, pour sélectionner les bactéries ayant incorporé le vecteur, et un segment de l'opéron lactose de *E. coli* codant la β -galactosidase, afin de sélectionner les clones bactériens contenant les vecteurs avec un fragment d'ADN inséré. Les inserts ont ensuite été amplifiés en utilisant les amorces universelles M13 sens et antisens et les amplicons de bonne taille ont été séquencés dans

les deux directions selon la technique du «Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing» décrite au paragraphe 2.3.1.7 ci dessus.

2.3.1.9. Analyse des séquences

Les séquences nucléotidiques des génomes des VHB ont été numérotées par rapport à la séquence complète du génome de la souche de référence HHVBBAS, numéro d'accès GenBank = X75657. Les électrophorégrammes des séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel SeqScape version 2.5 (Applied Biosystems). Les séquences ont été alignées et comparées avec le logiciel BioEdit version v7.0.5 (BioEdit Sequence Alignment Editor) et son programme intégré CLUSTAL W. Les régions des séquences présentant une ambiguïté ont été corrigées manuellement afin d'avoir des séquences homologues devant permettre de reconstruire les relations évolutives entre les virus. L'analyse phylogénétique était basée sur le génome complet ainsi que les quatre cadres de lecture chevauchants correspondant aux gènes *préS1/préS2*, *S*, *préC/C* et *X*. Soixante dix huit (78) souches de référence représentant les huit génotypes connus, ainsi que des souches de référence du génotype A1 d'Afrique de l'Ouest ; E, D3 et D4 de l'Afrique du Sud et de l'Afrique de l'Est (**Hannoun et al., 2005; Mulders et al., 2004; Sugauchi et al., 2003**) ont été incluses.

Les arbres phylogénétiques ont été construits avec le logiciel MEGA version 3.0, en utilisant la méthode du plus proche voisin ou « Neighbour-joining » et le modèle de correction de Kimura à 2 paramètres (K2P) pour le calcul des distances. Les valeurs statistiques placées sur les nœuds sont calculées par le *bootstrap* (méthode statistique qui estime la robustesse de l'arbre et des branches), en comparant 1000 fois la séquence de chaque souche à celles des autres. Si un arbre est robuste, c'est-à-dire fortement soutenu par les données, alors sa variabilité sera faible. Par contre si un arbre est peu robuste il

aura une grande variabilité. Ainsi, une valeur de *bootstrap* de 100% est équivalente à un nœud vrai ou robuste. Les phylogrammes ont été visualisés grâce au programme «TREEVIEW».

Les recombinaisons ont été identifiées en construisant des arbres phylogénétiques séparés des différents gènes ou des segments de gène. Il est admis qu'un événement de recombinaison a eu lieu chaque fois qu'un fragment génomique se regroupe avec des génotypes différents. Ces séquences ont aussi été analysées par la méthode de comparaison des points (ou de régions) de similarité (Similarity plots ou SimPlot). Le Simplot est une méthode qui permet une visualisation graphique de la comparaison globale de deux séquences. Les deux séquences à comparer sont placées le long des axes d'un graphique. L'intersection de chaque colonne et de chaque ligne est marquée d'un point si la lettre (ou la région) est la même dans les deux séquences (points de similitudes, région de similarité). La similarité entre séquences se traduit par une suite de points alignés : la diagonale en cas d'identité parfaite, un décalage par rapport à la diagonale indique une insertion (ou une délétion) et une inversion franche de l'orientation traduit une inversion d'une région d'ADN.

2.3.2. Deuxième population (VHB et CHC)

2.3.2.1. Cadre d'étude

Les patients présentant une suspicion de CHC ont été systématiquement inclus dans l'étude de novembre 2006 à juin 2007. Cette étude a mis à contribution :

– à l'hôpital de l'Amitié de Bangui le service d'hépatogastro-entérologie, pour le recrutement et l'inclusion des patients et le « Service de radiodiagnostic et d'Imagerie

Médicale » pour la réalisation des échographies hépatiques et les cytoponctions hépatiques

– à l’institut Pasteur de Bangui le « laboratoire d’analyses médicales » pour la sérologie et les examens de laboratoire et le laboratoire des Hépatites virales pour la biologie moléculaire

– le Laboratoire National de Biologie Clinique et de Santé Publique (LNBCSP) de Bangui pour la réalisation des examens cytopathologiques

2.3.2.2. Patients

De novembre 2006 à juin 2007, 68 sérums de patients des deux sexes hospitalisés dans le service d’hépto-gastro-entérologie et présentant une suspicion de CHC ont été collectés. Après avoir été identifiés, les patients étaient orientés en salle de radiologie pour une échographie hépatique et un consentement éclairé et signé leur était demandé. Les investigateurs chargés du recrutement des patients, remplissaient les feuilles de renseignement après un interrogatoire en notant : l’identification du patient, les caractéristiques sociodémographiques, les antécédents médicaux, et les signes cliniques (douleur de l’hypocondre droit, amaigrissement, asthénie, fièvre, ascite, hépatomégalie, oedème des membres inférieurs, circulations veineuses collatérales, ictère, vomissements).

2.3.2.3. Prélèvements

– Prélèvements sanguins

Deux types de prélèvements sanguins ont été réalisés :

– sur 2 tubes secs de 5 mL, dont l'un a été utilisé pour la recherche des marqueurs du VHB et éventuellement du VHD, le dosage des transaminases (ALAT et ASAT), de la bilirubine totale, conjuguée et non conjuguée, du taux de l'alphaprotéine (AFP) sérique qui constitue un marqueur biologique important pour le diagnostic du CHC. Le deuxième tube était centrifugé et le sérum récupéré était conservé à -80°C pour les études moléculaires ultérieures.

– sur un tube citraté pour le dosage du taux de prothrombine.

Les prélèvements sanguins identifiés (accompagnés de la feuille de renseignements) ont été analysés sans délai au niveau des laboratoires d'analyses médicales de l'IPB.

– Cytoponction hépatique

Lorsque le taux de prothrombine était supérieur ou égale à 50 % et qu'une masse tumorale était observée, un rendez-vous était donné au patient pour la réalisation de la cytoponction. Une anesthésie locale est réalisée avec de la lidocaine à 2%. La cytoponction hépatique échoguidée de la masse tumorale est alors pratiquée par le radiologue et son assistant. Une fraction du liquide de cytoponction récupéré dans un tube de congélation est placé dans une bouteille isotherme, acheminé sans délai et conservé à -80°C pour des analyses ultérieures une deuxième fraction est réservée aux examens cytopathologiques.

2.3.2.4. Analyses

– Sérologie

Il s'agit de la recherche des marqueurs du VHB selon l'algorithme en vigueur à l'IPB. Lorsque l'AgHBs est positif, nous recherchons les Ac anti-HBc, les AgHBe et anti-HBe,

ainsi que les AgDelta et anticorps anti-Delta. Si l'AgHBs est négatif, seuls les anticorps anti-HBc et anti-HBs étaient recherchés. Le dosage des transaminases (ALAT et ASAT), du taux de prothrombine et de l'alphafoetoprotéine sérique sont également pratiqués.

– Examens cytologiques

Afin de confirmer la présence d'un CHC, une partie du liquide de cytoponction hépatique (obtenue par aspiration des tissus mous) est étalé sur des lames porte-objets (de façon uniforme sans tourbillon ni va-et-vient) pour réaliser un frottis mince. Les lames ont été séchées à l'air et transportées au laboratoire d'anatomie pathologique le même jour, accompagnées des bulletins d'examen de cytologie. Les lames sont ensuite colorées au May-Grunwald-Giemsa par le technicien du service et remises à l'anatomo-pathologiste pour la lecture.

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. RESULTATS

Dans la première partie de ce travail nous présentons la caractérisation moléculaire des souches du VHB circulant en République Centrafricaine et la comparaison des séquences obtenues avec celles isolées dans d'autres pays d'Afrique. La deuxième partie est un travail préliminaire de recueil d'échantillons chez des patients atteints de carcinome hépatocellulaire (CHC) liés au VHB ce qui nous a permis de décrire les caractéristiques cliniques et biologiques de ces patients atteints d'une affection très fréquente en RCA.

3.1.1. Etude de la première population

3.1.1.1. Etude des marqueurs sérologiques du VHB

Dans le service d'Hépatogastro-entérologie de l'Hôpital de l'Amitié, 196 sérums provenant de 112 hommes et 84 femmes (sex-ratio = 1,3) ont été recueillis. L'âge des patients variait de 10 à 72 ans avec une moyenne de 30,4 ans. Ces patients ont été admis pour une suspicion d'hépatite et 183 d'entre eux avaient au moins un des marqueurs du VHB (AgHBs, anti-HBc, anti-HBs, ADN viral) (Tableau VII). En fonction de la présence (+) ou de l'absence (-) de l'AgHBs et des anticorps anti-HBc, les patients ont été classés en quatre groupes. Le groupe 1 est représenté par les patients AgHBs (+)/Anti-HBc (+) ; le groupe 2 par les patients AgHBs (+)/Anti-HBc (-) ; le groupe 3 par les patients AgHBs (-)/Anti-HBc (+) et enfin le groupe 4 par les patients négatifs pour les deux marqueurs : AgHBs (-)/Anti-HBc (-). De plus, les anticorps anti-HBs et l'ADN viral sérique ont été recherchés dans les 4 groupes.

– Parmi les 120 patients du groupe 1, l'ADN du VHB a été détecté chez 79 (66%) d'entre eux par PCR en temps réel (extrêmes : de 29 à $5,59 \times 10^7$ copies/mL) dont 9 seulement étaient positifs pour les anticorps anti-HBs. Ces patients avaient un taux moyen de transaminases (ALAT) très élevé (1158), variant de 22 à 8130 UI/L.

– Le groupe 2 est représenté par deux patients de sexe masculin chez lesquels l'AgHBs a été détecté mais, les Ac anti-HBc et anti-HBs étaient négatifs. Par contre, l'ADN du VHB était positif chez les deux mais, avec des charges virales faibles : 37 copies/mL pour le premier et 105 copies/mL pour le second. Le taux moyen des transaminases était modérément élevé.

– Dans le groupe 3 constitué de 60 patients, les anticorps anti-HBs ont été détectés chez 26 d'entre eux. Trois patients avaient une charge virale détectable mais, avec une valeur inférieure au seuil de détection (29 copies/mL), considérée comme non quantifiable. La moyenne du taux des transaminases était presque normale.

– Enfin, le groupe 4 comprenait 14 patients pour lesquels ni l'AgHBs ni les anticorps anti-HBc n'ont été détectés. Dans ce groupe, un seul patient était positif uniquement pour l'AgHBs et l'ADN viral n'a pas été mis en évidence chez les patients de ce groupe. Cependant, le taux moyen des transaminases était légèrement supérieur à la normale.

Tableau VII : Caractéristiques des patients centrafricains selon leur statut sérologique vis-à-vis du VHB

	AgHBs (+)/ Anti-HBc (+)	AgHBs (+)/ Anti-HBc (-)	AgHBs (-)/ Anti-HBc (+)	AgHBs (-)/ Anti-HBc (-)
Nombre de patients	120	2	60	14
Age moyen (extrêmes)	29,8 (10-70)	21,5 (18 ; 25)	33,4 (17-72)	24,3 (15-50)
Sexe ratio (H/F)	1,7	NA	0,9	0,8
Anti-HBs positif	9	0	26	1
Anti-HBs négatif	111	2	34	13
ADN VHB positif	79	2	3	0
Extrêmes (Copies/ml)	29 – 5,6 10 ⁷	37 ; 105	< 29	–
ALAT (UI/L)	1158	365	153,5	176,4
Extrêmes	(22 – 8130)	(179 ; 551)	(11 – 616)	(19 – 769)

AgHBs, antigène de surface du VHB

Anti-HBc, anticorps dirigés contre la protéine de la capsid «core» du VHB

Anti-HBs, anticorps dirigés contre l'antigène de surface du VHB

NA : non applicable (il s'agit de deux hommes)

ADN-VHB, ADN du virus de l'hépatite B (seuil de détection = 29 (± 3) copies/mL)

ALAT : Alanine aminotransférase (Normes = 11 à 66 UI/L)

3.1.1.2. Analyse des séquences et génotypage

Après la réalisation du séquençage de 66 souches, les séquences du génome complet ont été obtenues et analysées pour 30 souches de VHB isolées de patients ayant une charge virale supérieure à 1000 copies/mL. Du fait d'une faible charge virale (inférieure à 100 copies/mL), seulement des séquences partielles ont été obtenues pour 36 souches de VHB : 15 Prés, 14 X, 27 S et 6 PréC/C. Les 66 séquences ont été comparées à 78 séquences de souche de référence (GenBank) représentant les 8 génotypes connus. L'analyse phylogénétique de toutes ces séquences avec les souches de références a montré que 62 des 66 souches appartiennent au génotype E (94%), 3 (3,5%; RCA175, RCA177, RCA202) au génotype D et une souche (RCA204) au génotype A (les analyses phylogénétiques seront détaillées plus loin).

– Mutations observées dans le gène *S*

Parmi les 45 séquences du gène *préS/S* obtenues, 10 souches du génotype E présentaient des délétions de 3 à 33 nucléotides, correspondant aux acides aminés 1 à 11, dans la région PréS2. Toutes ces délétions se situaient à l'intérieur du cadre de lecture. Quelques mutations ont aussi été identifiées au niveau du déterminant « *a* » du gène *S*. Les principales mutations observées étaient les remplacements d'une glycine en une cystéine en position 588 (G588C) et, d'une cystéine par une arginine en position 546 (C546A) ; devant les substitutions G145A et T131N déjà décrites par Odemuyiwa et ses collaborateurs (**Odemuyiwa et al., 2001**). D'autres mutations observées étaient des substitutions non-synonymes de nucléotides correspondant aux mutations M103I, S143L/T et D144Q décrites par d'autres auteurs (**Weinberger et al., 2000 ; Weber, 2005**). Toutes ces mutations affectent la structure antigénique de l'AgHBs et pourraient mettre en défaut les trousse de détection commercialisées car l'AgHBs n'est pas détecté.

– Mutations observées dans la région PréS2

Huit souches du génotype E présentaient une mutation simple au niveau du codon d'initiation du gène *préS2*. En effet, la méthionine était remplacée par les acides aminés (aliphatiques) Valine pour les souches RCA067, RCA150, RCA165 ; et Isoleucine pour les souches RCA002, RCA047, RCA055, RCA060 et RCA083. Dans le cycle de multiplication du VHB, de telles mutations affectent l'expression de la protéine moyenne (M) d'enveloppe du VHB qui n'est plus alors synthétisée (Figure 23). Cette protéine ne semble pas être essentielle pour la morphogénèse des particules infectieuses, par conséquent, son absence ne nuit pas à la multiplication virale et l'AgHBs est normalement détecté.

	10	20	30	40	50
A1	MQWNSTAFHQ	TLQDPRVRGL	YLPAGGSSSG	TVNPAPNIAS	HISSISARTG DPVTNME
RCA204	A	F	L	V	S
D3	T	F	V	TT	P
RCA175	T	F	V	TT	P
D5	T	F	V	TT	P
X75657	T	A	F	V	TT
*RCA002	I	T	A	F	V
RCA006	T	P	A	I	F
RCA008	T	A	F	V	TT
RCA026	T	A	F	V	TT
RCA038	T	F	V	TT	L
RCA039	T	A	G	F	V
RCA040	T	A	K	F	V
*RCA047	I	T	A	F	V
RCA053	T	A	F	V	TT
*RCA055	I	T	A	F	V
*RCA060	I	T	A	F	V
RCA063	T	A	F	V	TT
*RCA067	V	KT	A	P	F
RCA069	T	A	K	F	V
RCA081	T	A	K	F	V
RCA082	T	A	K	F	V
*RCA083	I	T	A	F	V
RCA097	T	A	F	V	TT
RCA107	T	A	F	V	TT
RCA113	T	A	F	V	TTV
RCA115	T	Q	A	F	V
RCA123	T	A	F	V	TT
RCA131	T	A	F	Y	V
RCA138	T	A	F	V	TT
RCA144	T	A	F	V	TTV
RCA146	T	F	V	TT	L
*RCA150	V	KT	A	P	F
*RCA165	V	KT	A	P	F
RCA171	T	A	F	V	TT
RCA187	T	A	F	V	TT
RCA194	T	A	F	V	TT

Figure 23 : Alignement de la séquence en acides aminés de la région PrÉS2 de 33 souches de VHB de la RCA : comparaison avec les souches de référence des génotypes A1, D3, D5 et E (X75657).

Les souches ayant une mutation au niveau du codon d'initiation sont marquées par des étoiles : changement de la méthionine en valine (RCA067, RCA150, RCA165) et remplacement de la méthionine en isoleucine (RCA002, RCA047, RCA055, RCA060 et RCA083).

– Mutations observées dans les régions PrÉC et X

Neuf des 36 souches (25%), toutes du génotype E, présentaient une mutation au niveau du codon d'initiation de l'ORF du gène *prÉC* : il s'agit de la mutation G1896A où une glycine est remplacé par une alanine en position 1896. Cette mutation induit l'apparition d'un codon stop à la fin du segment PrÉC et abolit la synthèse de l'AgHBe.

Trente six séquences du gène *X* (chevauchant avec le promoteur du « core ») ont été

obtenues et les principales substitutions, A1762T et G1764A, correspondant aux changements des acides aminés K130M et V131I, décrits comme étant des points « chauds » de mutation («hot spot mutation sites»), ont été retrouvées chez 8 des 36 souches, toutes du génotype E.

Quelques clones de la souche RCA001 présentaient cette mutation rare au niveau du promoteur du gène « core ») affectant le site de liaison du facteur nucléaire des hépatocytes. Cette mutation déjà décrite par Fujiwara et ses collaborateurs (**Fujiwara et al., 2005**) semblerait être spécifique aux VHB de génotype E et correspondrait à des patients avec de faibles titres en AgHBe, une charge virale élevée et une progression vers la cirrhose. Les clones de souche RCA001 seront analysés ultérieurement.

3.1.1.4. Analyses phylogénétiques et détermination des génotypes

– Analyse basée sur la région S

Les séquences nucléotidiques de la région S de 56 des 62 souches de VHB de RCA du génotype E, obtenues directement après séquençage (▲CAR) ou bien d'abord clonées puis séquencées (■CAR), ainsi que 29 autres séquences de VHB du génotype E isolées dans plusieurs pays de l'Afrique Sub-saharienne et extraites de GenBank, ont servi à la construction de l'arbre phylogénétique (Figure 24). L'analyse phylogénétique montre que les 56 isolats de la RCA sont regroupés entre eux et à l'intérieur du cluster formé par les VHB du génotype E de plusieurs pays de l'Afrique Sub-saharienne (Figure n° 24).

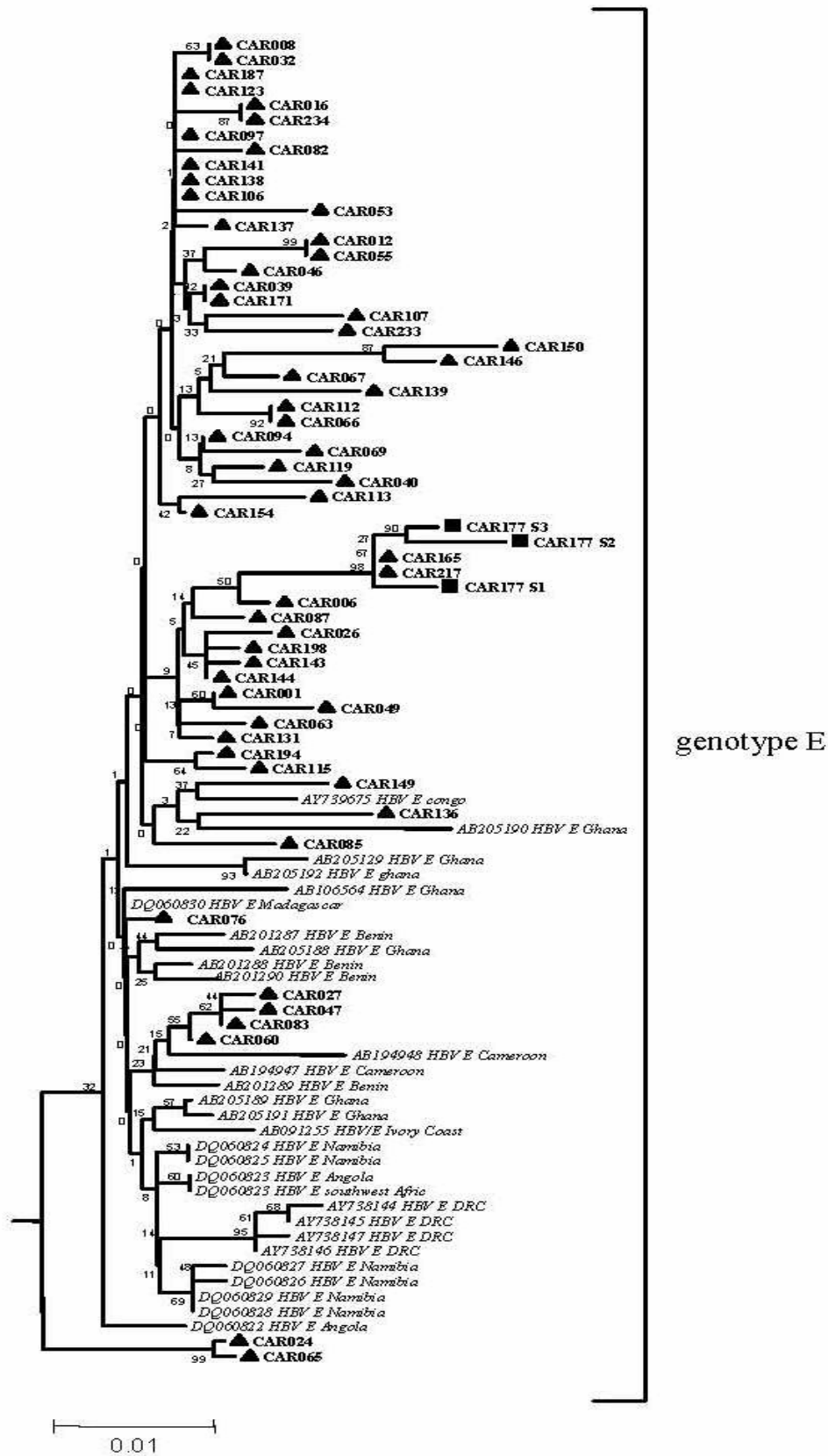


Figure 24 : Arbre phylogénétique de 56 souches du VHB/E de la RCA construit à partir du gène S: comparaison avec les souches de référence du génotype E. Les numéros d'accès sont indiqués sur l'arbre (▲ CAR : non cloné, ■ : clones CAR177).

– Analyse basée sur la région PréC/C

Un autre arbre phylogénétique a été construit à partir de la région PréC/C de 32 séquences de VHB de RCA (toujours du génotype E) obtenues directement après séquençage (▲CAR) et de 23 séquences obtenues après clonage (●CARc, ▲CARc). Elles ont été comparées à 29 autres séquences de référence des VHB du génotype E circulant en Afrique Sub-saharienne et enregistrées dans GenBank (Figure 25). L'analyse phylogénétique montre que les 56 séquences sont très proches entre eux soutenues par une valeur de bootstrap souvent supérieure à 80 %.

Cependant, cinq clones de la souche RCA001 (CAR001c1, CAR001c2, CAR001c3, CAR001c4 CAR001c5) fortement reliés entre eux (valeur de bootstrap variant de 88 à 100%) se détachent nettement de l'arbre pour former un groupe à part (Figure 25). En effet, l'analyse de séquences de ces cinq fragments avait mis en évidence cette mutation rare (décrite au paragraphe 3.1.1.4 : Analyse du gène *préC/C*) au niveau du promoteur du gène *C* : A1762T et G1764A (Fujiwara et al., 2005) correspondant aux changements des acides aminés K130M et V131I.

De plus, la séquence du gène *C* de ces 5 clones présentait des petites insertions de nucléotides, augmentant ainsi leur variabilité (3,5% de distance moyenne) par rapport aux autres souches. Ce qui se traduit par ce détachement et la formation d'une branche distincte à la base de l'arbre (Figure 25).

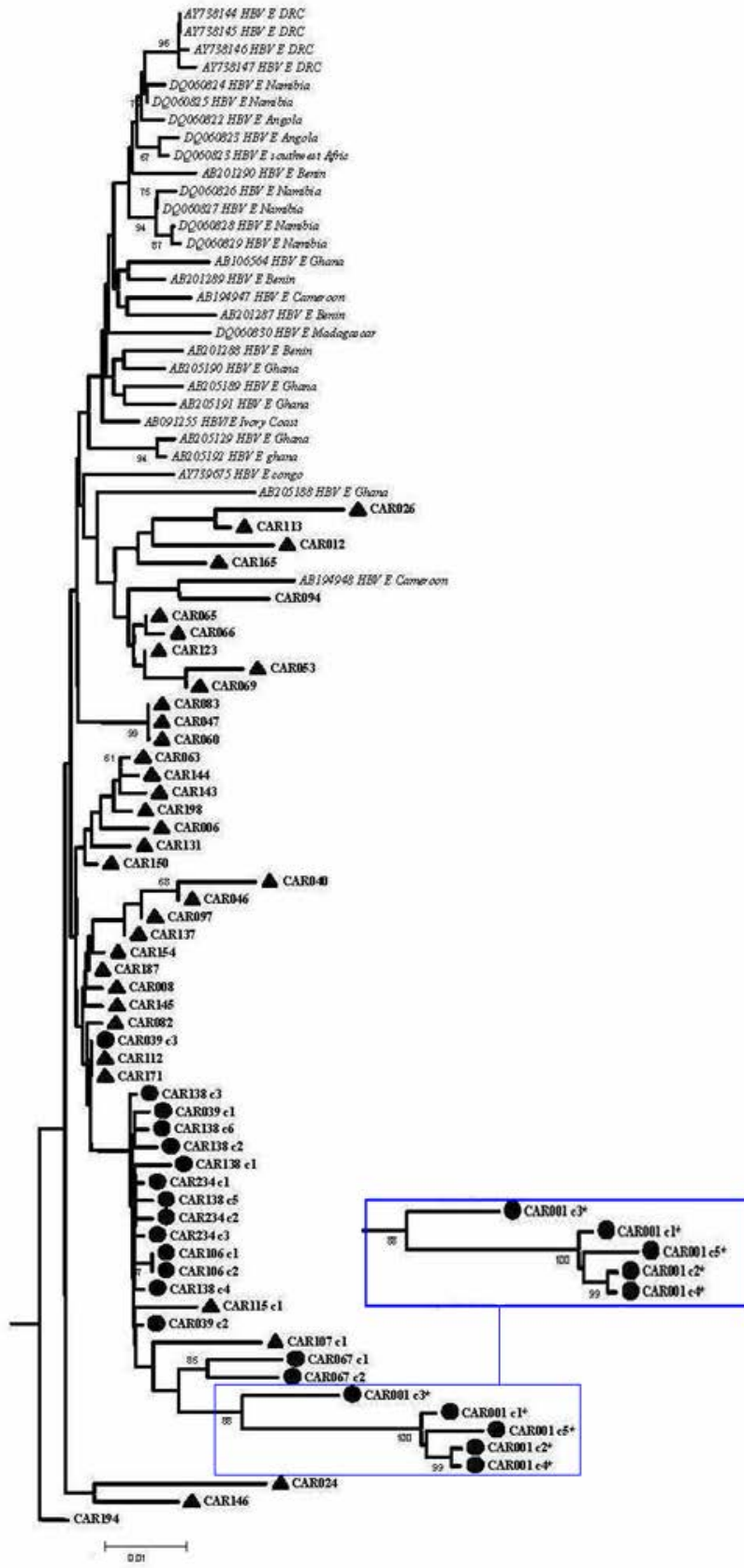


Figure 25: Arbre phylogénétique de 56 souches du VHB de la RCA construit à partir du gène *préC/C*: comparaison avec 28 souches de références du génotype E. (▲ CAR : non cloné, ● : clones RCA, * : Indique les clones avec insertions). Les numéros d'accès sont indiqués sur l'arbre.

– Analyse basée sur le génome complet

Les 30 souches de VHB de la RCA pour lesquelles une séquence complète du génome complet a été obtenue, ont été comparées à 31 souches de référence représentant les 8 génotypes connus (A à H) et deux souches de chimpanzé (Figure 26). L'analyse phylogénétique montre que toutes les souches de RCA de génotype E (28 VHB/E) sont regroupées dans le cluster contenant la souche de référence X75657 du génotype E (valeur de *bootstrap* 100 %). La variabilité intragroupe au sein des souches du VHB du génotype E de la RCA est de 1,37% en ce qui concerne le génotype complet, de 1,08% pour le gène *préS/S*, 1,59% pour le gène *préC/C* et enfin de 1,77% pour le gène *X*. La comparaison des séquences des souches de VHB du génotype E des patients centrafricains avec les séquences des souches provenant du Bénin, Togo, Mali, Burkina-Faso, Nigeria et du Cameroun, montre une moyenne d'identité nucléotidique de 99,3% (variant de 98,2 à 100%) à l'exception de la souche RCA001 (94 à 96,5%).

Les souches du génotype A et D seront analysées dans les prochains paragraphes.

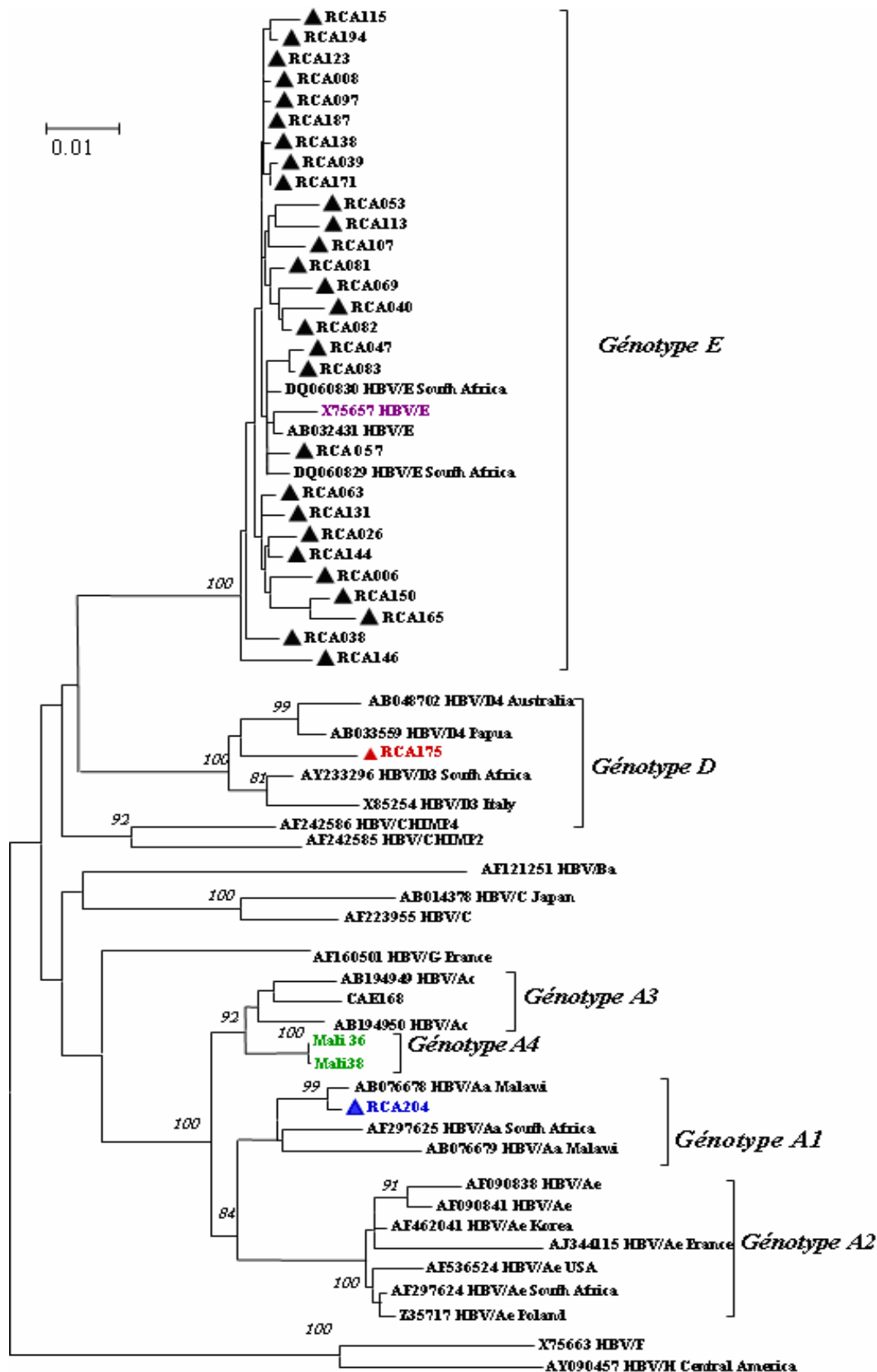


Figure 26 : Arbre phylogénétique du génome complet des 30 souches de VHB de la RCA : comparaison avec 31 souches de référence des génotypes A à H. (▲RCA: souches centrafricaines). Les numéros d'accès sont indiqués sur l'arbre. L'échelle des barres représente le taux de substitution par site. Les nombres sur les nœuds sont les valeurs de Bootstrap et les valeurs inférieures à 50 % ont été supprimées

– Détermination des sous-groupes des souches de génotypes A et D

Analyse à partir de la région S

Parmi les 8 génotypes connus du VHB, quatre sous-groupes ont été définis pour les génotypes A (A1 à A4) et D (D1 à D4). Afin de déterminer à quels sous-groupes les souches de la RCA, les séquences du gène *S* de la souche RCA 204 (génotype A), de 7 clones de la souche RCA175 (◇CAR175) et la séquence du gène *S* de la souche RCA 202 (▲CAR202) ont été comparées avec les séquences de référence de différents sous-groupes des génotype A et D (Figure 27).

L'analyse phylogénétique montre que la souche du génotype A (RCA204) est très proche des souches de génotype A de sous-groupe A1 isolées en Tanzanie (AY934773), au Malawi (AB076678), et quelques autres souches du génotype A1 de l'Afrique de l'Est et du Sud (Figures 27a).

Les régions *S* de 2 des trois souches du génotype D (RCA175, RCA202) étaient plus proche des souches du génotype D4 isolée en Somalie (Norder et al., 2004), avec une distance moyenne de 0,6% pour RCA175 et de 1,3% pour RCA202, mais éloignées des souches de génotype D3 de l'Afrique du Sud (3% de distance moyenne) (Figure 27b).

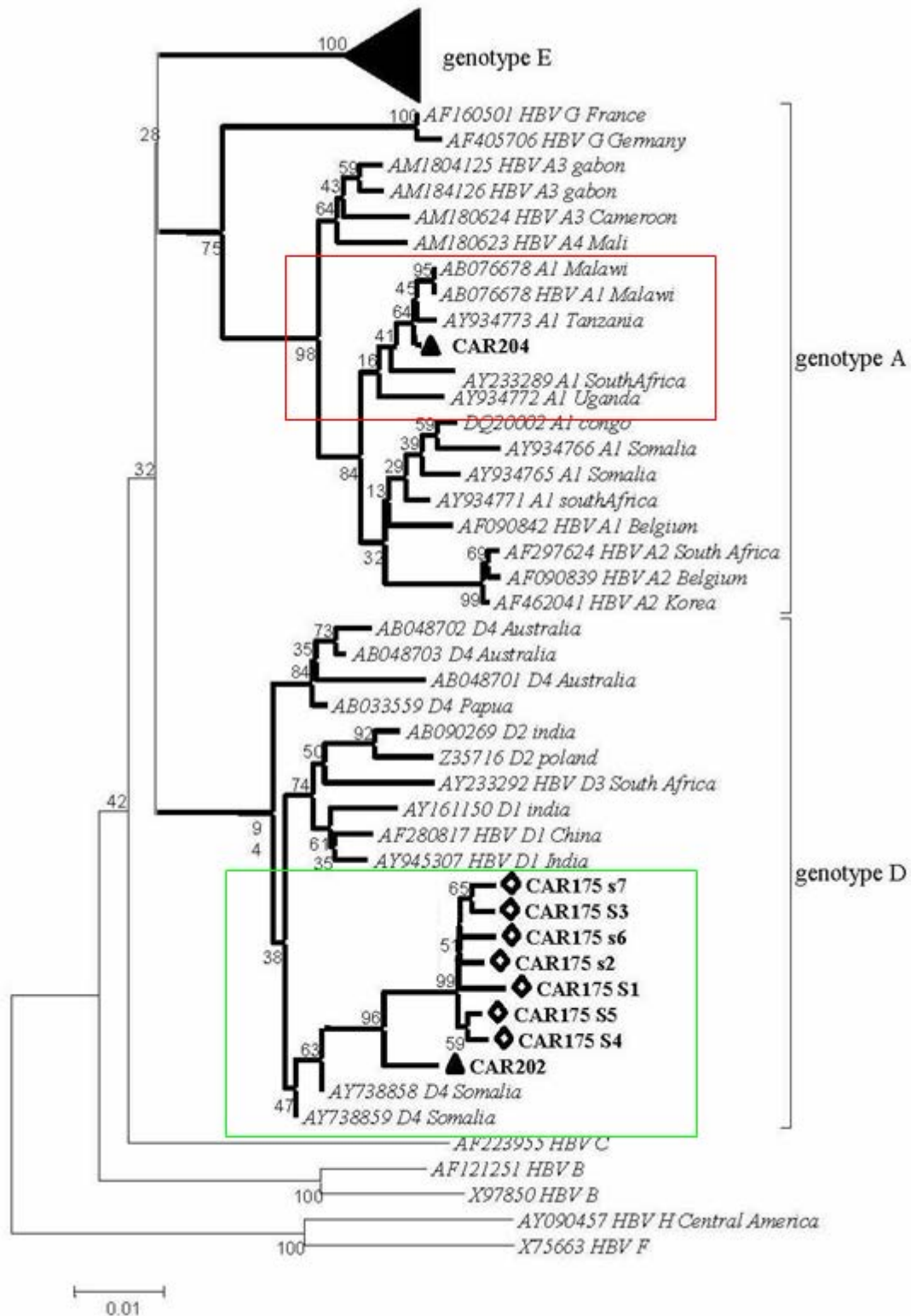


Figure 27 : Arbre phylogénétique construit à partir du gène S des souches de génotypes A et D de la RCA : comparaison avec les souches de référence des génotypes A, E et D. (▲ CAR : non cloné, ◇ : clones CAR 175). Les numéros d'accès sont indiqués sur l'arbre.

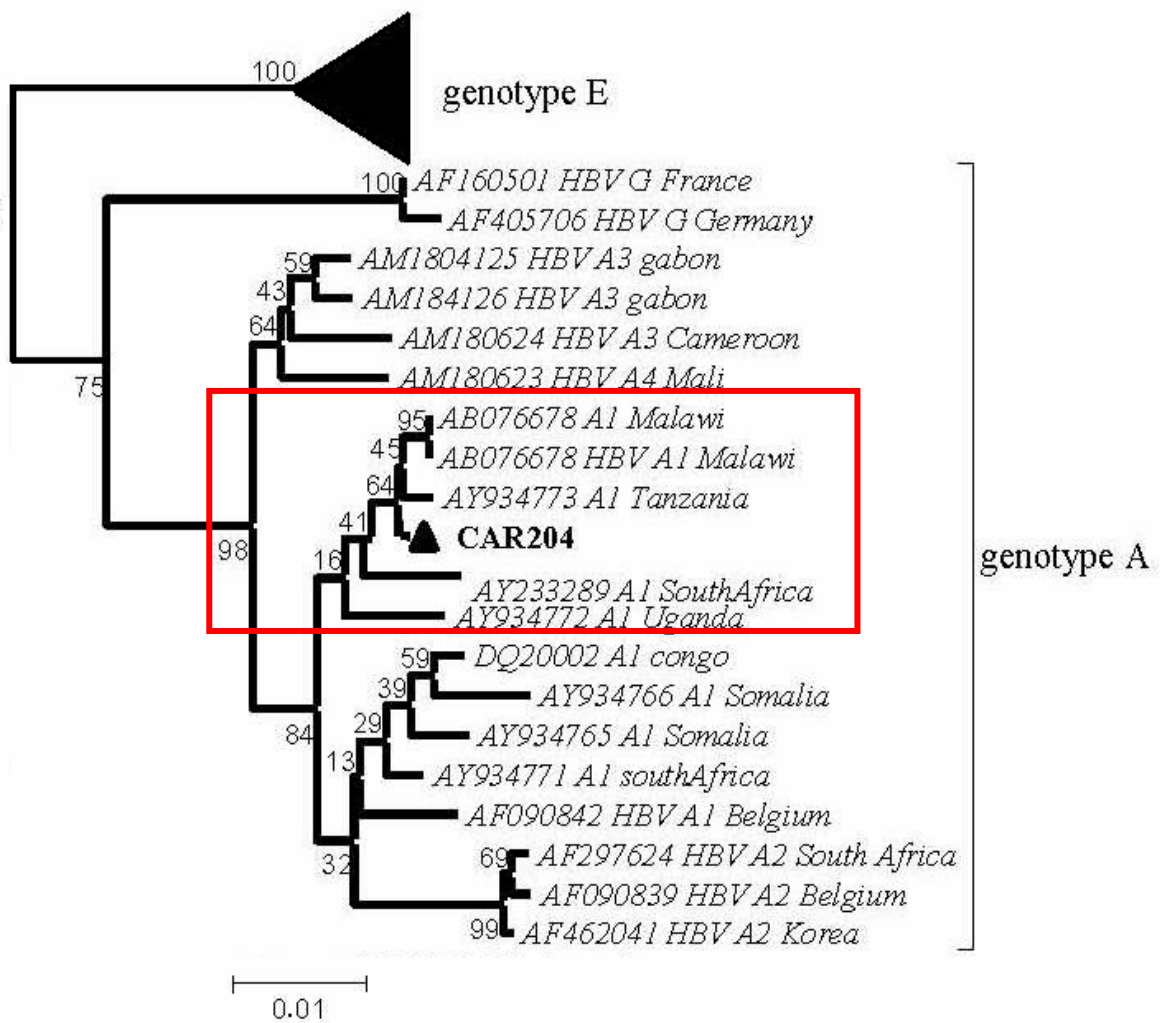


Figure 27a: Arbre phylogénétique détaillé de la souche RCA 204 construit à partir du gène S : comparaison avec les différents sous-groupes des souches de référence du génotype A. Les numéros d'accès sont indiqués sur l'arbre (▲ CAR : souche centrafricaine).

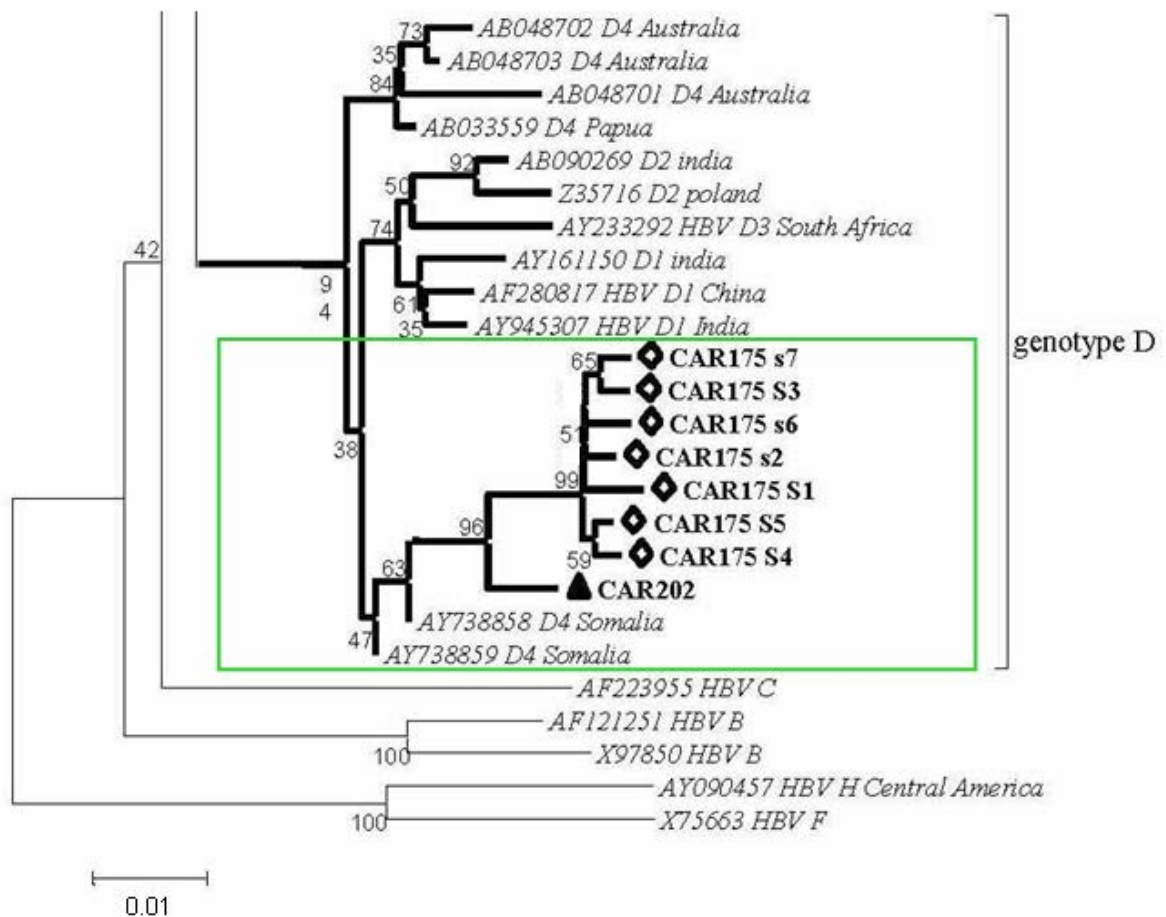


Figure 27b: Arbre phylogénétique détaillé des souches RCA175 et RCA202 construit à partir du gène S: comparaison avec les différents sous-groupes des souches de référence du génotype D. (◇ : clones CAR175, ▲CAR : non cloné). Les numéros d'accès sont indiqués sur l'arbre.

Analyse de la souche RCA177 basée sur la région PréC/C

Pour la 3^{ème} souche du génotype D (RCA177), seulement une séquence partielle du gène *préC/C* disponible a été analysée par clonage. L'analyse phylogénétique de la séquences de 4 clones de la souche RCA177 (■CAR177c), de 3 clones de la souche 175(◇CAR175c) la séquence de la région C de la souche RCA175 (▲CAR175) par rapport aux souches de référence du génotype D (D1 à D4) a montré que la souche RCA 177 appartient à un groupe à part («outlier») du génotype D3 avec une distance moyenne de 4,2% (Figure 28 ; 28a). Compte tenu de la distance observée entre la souche RCA177

et les autres souches du génotype D, celle-ci a été retenue pour la recherche d'infections mixtes.

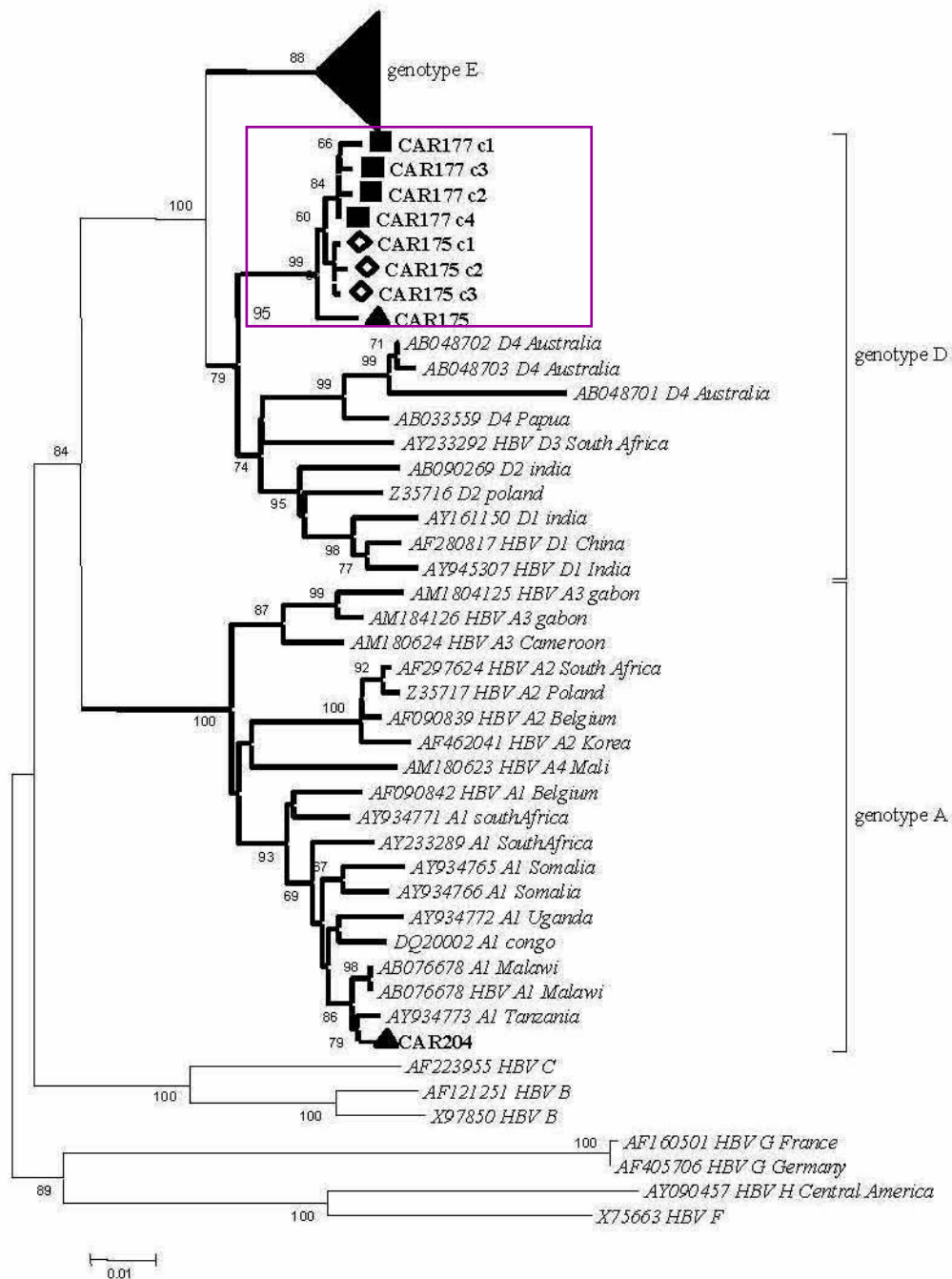


Figure 28 : Arbre phylogénétique construit à partir du gène C des souches de génotypes A et D de la RCA : comparaison avec les souches de référence des génotypes A, E et D.

(■ : clones CAR177,◇: clones CAR175, ▲CAR :non cloné). Les séquences sont comparées aux souches de référence des génotypes A et D. Les numéros d'accès sont indiqués sur l'arbre.

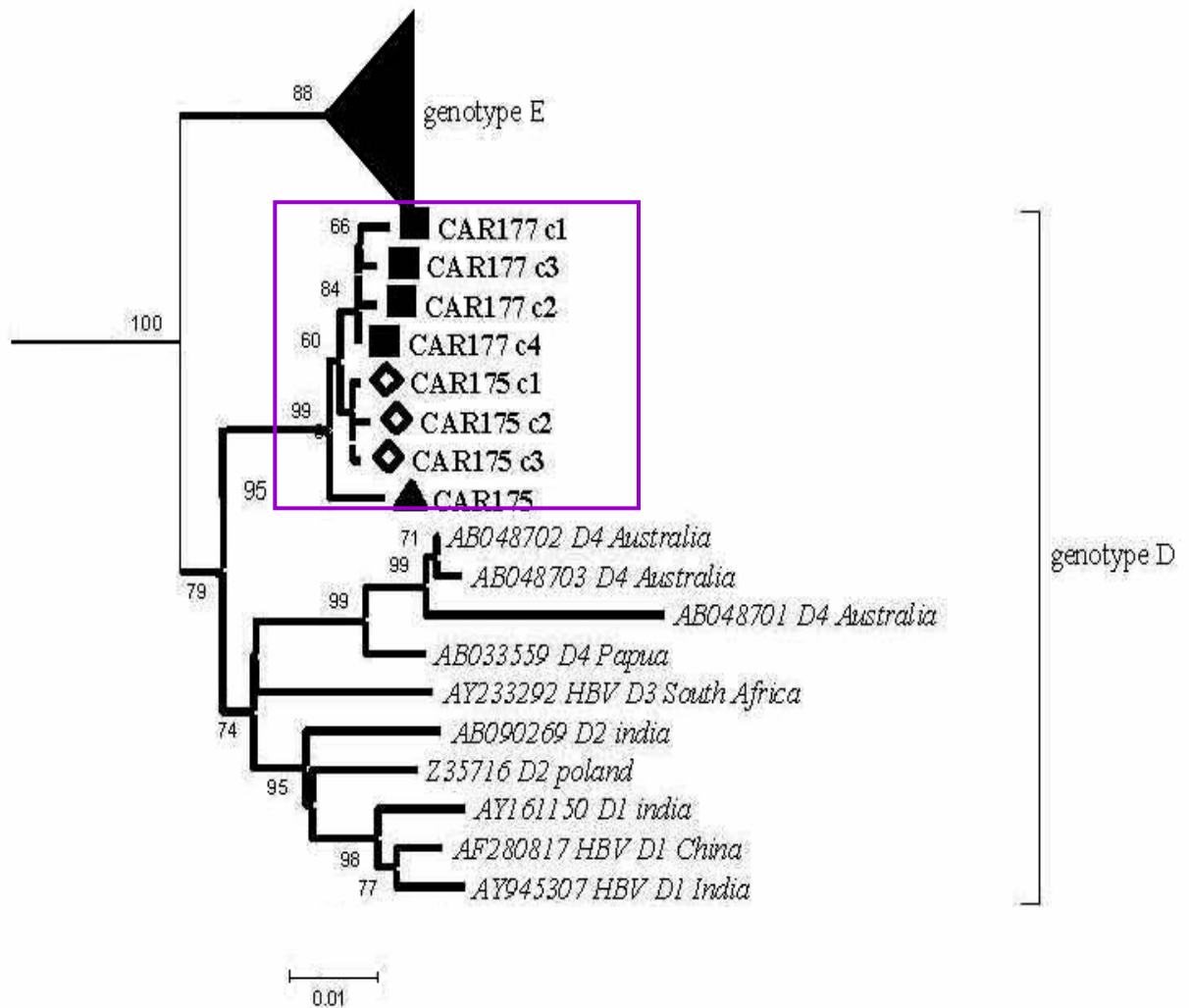


Figure 28a : Arbre phylogénétique détaillé des souches RCA175 et RCA177 construit à partir du gène C: comparaison avec les différents sous-groupes des souches de référence du génotype D. (■ : clones CAR177, ◇ : clones CAR175, ▲ CAR175 : non cloné). Les numéros d'accès sont indiqués sur l'arbre.

3.1.1.5. Recherche d'infections mixtes et recombinaisons

Douze échantillons présentant des nucléotides mixtes au niveau de leur électrophorégrammes de séquençage ont été sélectionnées pour la recherche des infections mixtes en clonant, les produits de PCR des gènes *préS*, *S* ou du gène *C* dans un vecteur plasmidique, comme indiqué dans le paragraphe « 2.3.1.8 clonage », du chapitre matériel et méthodes. Pour chacun des gènes, le séquençage a été réalisé dans les deux sens et 6 à 8 clones ont été séquencés de façon à détecter les erreurs éventuelles de l'ADN polymérase lors de la PCR. Les souches RCA001 et RCA177 qui présentaient

respectivement des moyennes de distance de 3,5% et 4,2% ont également été incluses dans cette analyse.

Finalement, à part ces mutations rare (non-synonymes) identifiées au niveau du promoteur du gène «core», le clonage n'a pas mis en évidence des infections mixtes pour la souche RCA001.

En revanche, les analyses phylogénétiques cumulées à comparaison des points de similarité (Similarity plots ou SimPlot) de la souche RCA177 ont montré que les fragments *S* et *X* de cette souche appartiennent au génotype E. Cependant, à l'intérieur du cadre de lecture du gène *préC/C*, le génotype E a été partiellement remplacé par un fragment du génotype D3 de 358 pb. La cartographie obtenue après l'analyse par comparaison des points de similarité (SimPlots) situe respectivement les sites de recombinaisons E/D et D/E aux positions 1723 et 2081 respectivement (nucléotides 200 et 558 à l'intérieur du fragment C) ; ce qui correspondant essentiellement au premier tiers du grand fragment C de 1067pb (Figure 29).

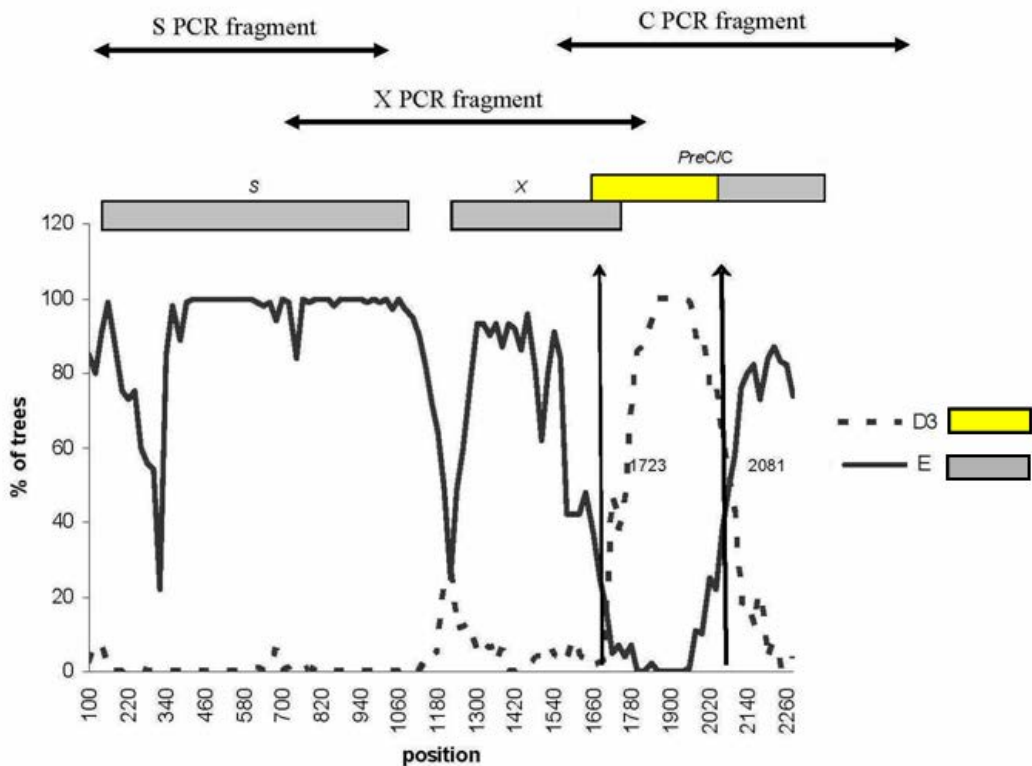


Figure 29: Comparaison des points de similarité (méthode SimPlot) des gènes *S*, *X* et *préC/C* de la souche RCA177 avec les séquences des génotype E et D3.

Les sites de recombinaison sont indiqués par les flèches ; ligne pleine : génotype E ; ligne pointillée : génotype D3

3.1.2. Descriptions cliniques et biologiques des patients atteints de CHC

(Deuxième population : VHB et CHC)

Dans le but de mieux comprendre l'implication du VHB dans le développement du CHC en RCA, nous avons choisi d'effectuer une étude pilote chez les patients suspectés de CHC. Les patients présentant une suspicion de CHC ont été systématiquement inclus dans l'étude du 03 Novembre 2006 au 03 Juin 2007. Un bilan biologique, virologique (VHB et VHD (l'agent Delta)) et échographique a été systématiquement pratiqué. La confirmation de CHC a été apportée par les examens cytologiques réalisés à partir de liquide de cytoponction hépatique de la masse tumorale.

3.1.2.1. Données sociodémographiques

Au total, 68 sérums ont été collectés de 45 hommes et 23 femmes soit un sexe ratio de 2 (~1,95). L'âge des patients variait de 17 à 71 ans avec une moyenne de 48 ans. Les patients du sexe masculin de 50 ans et plus étaient les plus représentés alors que la population féminine était représentée par des sujets plus jeunes. La répartition des patients en fonction de l'âge est représentée dans le tableau VIII. La majorité de ces patients étaient issus de la ville de Bangui et de ses environs (sur un rayon de 50 km) et quelques uns venaient des provinces. Toutes les couches socioprofessionnelles étaient touchées avec une prédominance de retraités et des patients exerçant une profession libérale.

Tableau VIII : Répartition des patients selon l'âge et le sexe

Age	Sexe		Total
	Masculin	Féminin	
< 30 ans	7	1	8
30 – 40 ans	5	12	17
41 – 50 ans	6	2	8
51 – 60 ans	17	6	23
≥ 60 ans	10	2	12
Total	45	23	68

3.1.2.2. Principaux signes cliniques observés chez les patients

Au moment du diagnostic, les principales anomalies cliniques (Tableau IX) observées chez les patients étaient la douleur de l'hypochondre droit (qui était le principal motif de consultation et de l'hospitalisation), une hépatomégalie et un amaigrissement (altération

de l'état général (AEG) par une perte du poids > 10%) dans 100% des cas. Dans l'ordre d'importance, les autres signes cliniques étaient : une asthénie (64,7%), une ascite (48,5%), une jaunisse (36,8%), une fièvre (25%), des vomissements (23,5%) et une circulation collatérale abdominale (13,2%) traduisant une hypertension portale.

Tableau IX : Distribution des patients selon les signes cliniques

Signes cliniques	Nombre de patients N = 68	Fréquence (%)
Signes fonctionnels digestifs		
– Douleur de l'hypochondre droit	68	100
– Vomissements	16	24
Signes généraux		
– Amaigrissement	68	100
– Asthénie	44	65
– Fièvre (>38,5°C)	17	25
Signes physiques		
– Ballonnement abdominal*	33	49
– Hépatomégalie	68	100
– Ictère	25	37
– Oedèmes des membres inférieurs	7	10
– Circulations collatérales abdominales	9	13

* indique un ballonnement abdominal dû à une ascite

3.1.2.3. Bilan de l'échographie abdominale des patients

L'échographie abdominale a été réalisée chez tous les patients. L'aspect échographique dominant a été l'hépatomégalie d'échostructure hétérogène dans 61 cas, soit une fréquence de 90%. Les lésions hépatiques se répartissaient en deux entités différentes : les masses (42 cas sur 61 soit 69%) et les nodules uniques ou multiples de taille variable (19 cas soit 31%). Quand leur aspect échographique correspondait à une

zone hyperéchogène un CHC était suspecté. Chez les 7 autres patients, bien que la taille du foie était augmentée, l'échographie n'a pas révélée de lésions particulières (Tableaux X, XI et XII).

L'échographie a permis également la réalisation d'une cytoponction hépatique dirigée (lorsque celle-ci n'était pas contre-indiquée) car, seul l'examen cytologique permet de faire le diagnostic cytologique de certitude du CHC. Les résultats des examens cytologiques seront analysés dans les prochains paragraphes.

Tableau X : Répartition des patients selon les caractéristiques de l'hépatomégalie

Caractéristiques de l'hépatomégalie		Effectif (N = 68)	Fréquence (%)
Sensibilité	Douloureuse	68	100
	Indolore	0	0
Surface	Régulière	7	10
	Irrégulière	61	90
Consistance	Dure	61	90
	Molle	7	10
Bord inférieur	Mousse	3	4
	Tranchant	65	96
Echostructure	Homogène	7	10
	Hétérogène	61	89

En résumé, nous pouvons dire que 90% des patients (61 cas) présentaient une hépatomégalie hétérogène, douloureuse, à surface irrégulière (les contours du foie sont déformés) et de consistance dure.

Tableaux XI : Répartition des hépatomégalies selon les types de lésion

Caractéristiques des lésions		Effectif (N = 61)	Fréquence (%)
Masses (N = 42)	Hypoéchogènes	2	3
	Hyperéchogènes	40	65
Nodules (N = 19)	Hypoéchogènes	15	24
	Hyperéchogènes	4	7
Total (N = 61)		61	100

Les lésions hépatiques étaient dominées par des masses hyperéchogènes tandis que les nodules sont plus hypoéchogènes.

3.1.2.4. Caractéristiques biologiques des patients

L'augmentation des transaminases (ALAT) était la plus fréquente des anomalies biologiques (94% soit 64 patients). Des taux élevés de l'AFP (> 500 UI/mL) ont été trouvés chez 40 (59%) patients. Cependant, aucune augmentation de l'AFP sérique n'a été observée pour 3 patients malgré une forte suspicion de CHC à l'échographie. Les autres anomalies traduisant une atteinte hépatique grave étaient : un taux très élevé de la bilirubine conjuguée (cholestase intrahépatique) et aussi un taux de prothrombine (TP) très abaissé, surtout chez les patients suspectés de CHC (60%). Par conséquent, la cytoponction hépatique n'a pas pu être pratiquée chez tous les patients suspectés de CHC.

3.1.2.5. Etude des marqueurs du VHB et du VHD

Sur 68 patients recrutés, 100% (68/68) étaient ou avaient été infectés par le VHB (anticorps anti-HBc positifs). Aussi, selon leur statut sérologique par rapport au VHB et

au VHD, ainsi que les caractéristiques cliniques et biologiques, ils pouvaient être répartis globalement en deux groupes (Tableau XII).

Dans le premier, 43 (63,2%) patients avaient une forte suspicion de CHC à l'échographie. L'AgHBs était présent chez 10 (23,2%) d'entre eux et les anticorps anti-HD ont été détectés chez 7 patients. La moyenne du dosage de l'alphafœtoprotéine (AFP) sérique chez ces 43 patients était de 10394 (variant de 200 à 80000) UI/mL. Le taux de l'AFP n'était cependant pas élevé chez tous car, chez 5 patients la valeur était normale (variant de 200 à 400 UI/mL).

Le 2^{ème} groupe était représenté par 25 (36,8%) patients atteints d'hépatites chroniques (actives ou porteurs inactifs) parmi lesquels 7 ne présentaient aucune lésion hépatique importante à l'échographie. L'AgHBs a été détecté chez 21 (84,0%), parmi ceux-ci 11 étaient co-infectés par le VHD et la moyenne du dosage de l'AFP était de 9 (0,5 – 14,8) UI/mL.

Tableau XII : Répartition des patients selon la sérologie VHB/VHD et les analyses biologiques

Analyses réalisées	Nombre de patients recrutés	
	N = 68	
	Suspicion de CHC*	Hépatites chroniques†
	N = 43 (63,2%)	N = 25 (36,8%)
Recherche des marqueurs VHB/VHD		
– Anti-HBc; N = 68 (100%)	43	25
– AgHBs; N = 31 (45, 6%)	10	21
– AgHD** ; N = 0 (0%)	0	0
– Anti-HD** ; N = 18 (58%)	7	11
Examens biologiques		
– ALAT UI/L (Extrêmes)	638 (75 – 2400)	116,8 (92 – 719)
– AFP [▲] UI/mL (Extrêmes)	10394 (200 – 80000)	9 (0,5 – 14,8)
– Pourcentage TP [■] (Extrêmes)	48 (18 – 70)	62 (47 – 100)
– Bilirubine mg/mL		
Totale [●] (Extrêmes)	104, 7 (22,2 – 362, 6)	20,6 (1,2 – 72,5)
Conjuguée [■] (Extrêmes)	66,1 (17,2 – 200,9)	15,1 (1,1 – 21,2)
Non conjuguée [■] (Extrêmes)	38,8 (12 – 161,7)	4,5 (2,7 – 15,8)

AgHBs : antigène de surface du virus de l'hépatite

Anti-HBc : anticorps dirigés contre la protéine du « core »

AgHD** et Anti-HD** : marqueurs de l'agent Delta recherchés seulement chez les patients AgHBs (+)

AFP[▲] : Alphafoetoprotéine sérique, normes = 500 UI/mL

CHC* : suspicion de carcinome hépatocellulaire dont 14 confirmés par les examens cytologiques

Hépatites chroniques[†] : active et portage inactif

TP[■] : Taux de prothrombine

Bilirubine totale[●] : normes; 3 – 22 ; Conjuguée[■] : normes; 0 – 5 et Non conjuguée[■] : normes; 0 – 19

3.1.2.6. Résultats des examens cytopathologiques

Chez la majorité de patients chez qui une masse a été observée, la cytoponction n'a pas pu être pratiquée car le taux de prothrombine était inférieur à 50% (risque d'hémorragie) avec une moyenne de 48% (variant de 18 à 70%). Finalement, une cytoponction hépatique échoguidée n'a été réalisée que chez 17 patients.

Les examens cytopathologiques ont montré que 14 cytoponctions avaient un aspect cytologique en faveur d'un CHC. Malheureusement deux frottis étaient acellulaires (nombre de cellules insuffisantes) donc ininterprétables et pour l'autre, il s'agissait d'un abcès de foie.

3.1.2.7. Concordance du diagnostic échographique et de la cytologie

Même si la cytoponction n'a pas été réalisée chez les 43 patients suspectés de CHC suite à une échographie, le diagnostic cytologique des lésions a été positif dans 82,3% des cas (14/17).

3.2. DISCUSSION

La prévalence élevée de patients infectés par HBV est certes liée à leur recrutement dans un service d'hépatologie. Cependant, une étude réalisée entre Novembre et Décembre 2005 chez 525 enfants centrafricains consultant pour une suspicion de paludisme a montré que la prévalence des marqueurs du VHB était de 10 % pour l'AgHBs et de 16 % pour les anticorps anti-HBc (**travaux de thèse de Ndala Stella, Institut Pasteur de Bangui**). avec une augmentation brutale du taux d'anticorps anti-HBc (49,1 %) dans la tranche d'âge des 10-16 ans, suggérant une acquisition de l'infection lors des jeux, de la pratique de sport ou des premiers rapports sexuels. Cette dernière hypothèse est renforcée par les résultats d'un dépistage réalisé chez les adolescents et jeunes adultes sexuellement actifs reçus en consultation au centre MST/SIDA de Bangui, qui a montré que la prévalence de l'infection par le VHB était de 89 % et celle de l'AgHBs était de 15,4% (**Pawlotsky et al., 1995**).

La présente étude montre que le VHB de génotype E, largement prédominant en Afrique sub-saharienne dans un territoire allant du Sénégal à l'Angola (Figure 31), s'étend assez loin à l'Est incluant au moins les régions les plus peuplées de la RCA. Plus de 98% de séquences ont été obtenues chez les patients AgHBs et Anti-HBc positifs atteints d'hépatite chronique. Ainsi cette prévalence élevée pourrait être biaisée si les souches du génotype E sont plus susceptibles de provoquer des infections chroniques ou bien s'ils ont une infectivité périnatale plus élevée. Cependant, des études semblables réalisées avec des populations non sélectionnées dans d'autres pays de l'Afrique Subsaharienne (Bénin, Togo, Mali, Gabon et le Cameroun), et chez les patients atteints d'hépatite chronique au Nigeria et en Côte d'Ivoire (**Odemuyiwa et al., 2001; Suzuki et al., 2003; Mulders et al., 2004; Fujiwara K et al., 2005; Makuwa et al., 2006; Olinger**

et al., 2006; Huy et al., 2006) ont montré aussi une prévalence élevée du génotype E. Celle-ci variait de 43% au Cameroun à 87,4% chez les patients atteints d'hépatite en Côte d'Ivoire, mais elle reste néanmoins inférieure à celle observée en RCA.

La variabilité des séquences entre les souches de la RCA au sein du génotype E reste faible (1,37%) en ce qui concerne le génome complet ; cela n'augmente pas non plus lorsque ces séquences sont comparées aux séquences génomiques complètes de tous les VHB du génotype E enregistrées dans les bases de données (1,67%). Des analyses précises par comparaison de séquences ont montré que la majorité des souches centrafricaines du génotype E était semblable aux souches isolées dans certains pays de l'Afrique de l'Ouest. En effet, le génotype E est présent dans de nombreux pays d'Afrique de l'Ouest, en République Démocratique du Congo et en Angola où il est soit le seul génotype présent soit le génotype prédominant. La faible variabilité de séquence du génotype E et son endémicité exclusive en Afrique Sub-saharienne laisseraient penser qu'il est d'émergence récente, à partir d'un virus apparenté, au sein des populations africaines (**Mulders et al., 2004**). Le génotype E n'a pas été décrit jusqu'à présent au sein de la population noire d'Amérique originaire d'Afrique mais quelques cas isolés ont été décrits chez les africains noirs vivant en Europe (**Ganne-Carrie et al., 2006**) et chez un argentin d'origine africaine en Amérique du sud (**Mathet et al., 2006**). Cela renforce l'hypothèse selon laquelle une introduction récente dans la population africaine aurait pour origine le singe, et plus particulièrement le chimpanzé, dont les virus ont des ADN de séquences proches de celle du génotype E. (**Norder et al., 1994; Aurauz-Ruiz et al., 1997; Takahashi et al., 2000**). Après un tel événement, dû à un contact accidentel, une dissémination rapide à la faveur de brassage de populations pourrait expliquer une distribution géographique relativement limitée et l'apparente homogénéité de ce

génotype. La faible diversité du génotype ainsi que les faibles valeurs de Bootstrap ne permettent pas de délimiter les régions géographiques d'où le virus a pu émerger.

La souche de génotype A1 présente en RCA diffère de celles décrites au Cameroun et au Mali mais elle se regroupe dans un cluster avec les souches du génotype A1 fréquemment décrites en Afrique Orientale et du Sud (Malawi, Tanzanie, Ouganda et Afrique du Sud (**Kramvis et al., 2002; Sugauchi et al., 2002; Kimbi et al., 2004 Hannoun et al., 2005**)).

Les trois souches de génotype D selon leur embranchement sur l'arbre et les distances génétiques, semblent partager un ancêtre commun avec les souches identifiées comme étant du groupe D4. Ces souches très minoritaires pourraient être d'importation.

Les recombinaisons de génomes de VHB semblent être plus fréquentes que prévues (**Hannoun et al., 2000; Sugauchi et al., 2002; Kurbanov et al., 2005**). Plusieurs génotypes hybrides ont été décrits tels que C/D au Tibet (**Cui et al., 2002**), une recombinaison entre les génotypes A et C au Viêt-Nam (**Hannoun et al., 2000**). Au Nigeria, le génotype A (**Mulders et al., 2004; Olinger et al., 2006**) recombiné avec une séquence E/D en une triple recombinaison. Ici un nouvel hybride, du VHB de génotypes E (gènes *S-X*) et D (gène *préC/C*), a été identifié. Le site de recombinaison a été localisé dans le gène *C*, mais il n'est pas possible de déterminer si la souche d'origine est du génotype D3 ou du génotype D4, car seule une séquence incomplète des souches somaliennes du génotype D4 est disponible. Les séquence de la région correspondant aux gènes *X* et *C* des génotypes E et D sont très semblables suggérant qu'un précurseur de génotype D aurait fourni les gènes *X/C* au génotype E (**Bowyer et al., 2000**).

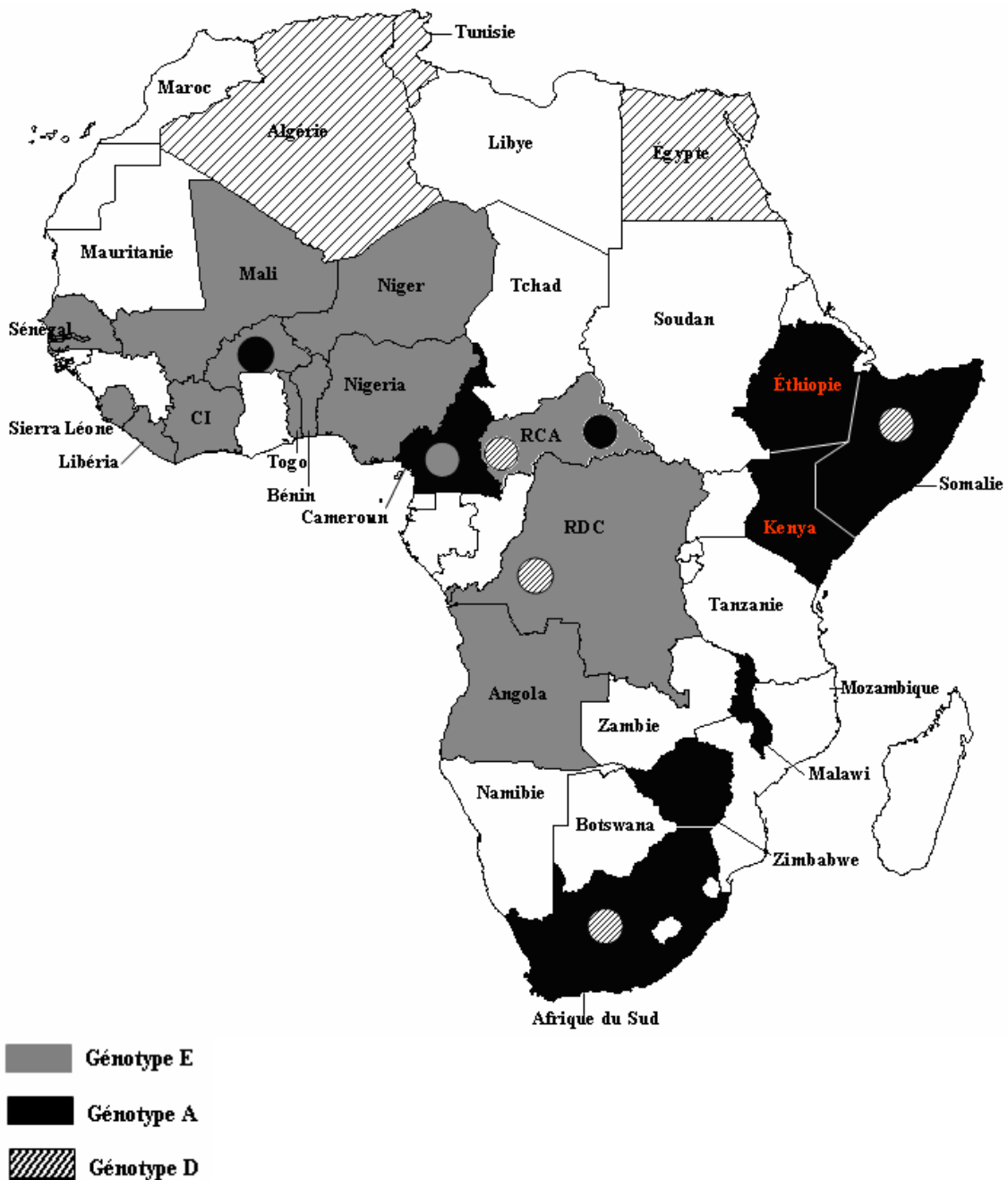


Figure 30 : Répartition des génotypes du VHB en Afrique.
 Les différentes couleurs indiquent les différents génotypes.

Les résultats partiels de la 2^{ème} partie de ce travail montrent que le carcinome hépatocellulaire est une pathologie fréquente en RCA avec une prédominance dans la population masculine et, selon les données de l'imagerie médicale, les patients consultent à un stade terminal de la maladie. Ce travail confirme aussi la relation entre le VHB et

CHC en RCA. De plus, chez 26,5% des patients le virus de l'hépatite Delta (VHD) est associé aux formes graves de la maladie. Quelques études ont montré que la surinfection par le VHD entraîne fréquemment une hépatite chronique active qui évolue dans 60 à 70% des cas vers des cirrhoses juvéniles (en 2 à 6 ans) et s'associe à un développement précoce du CHC (**Mammette A, 2002**). Cependant, le potentiel oncogénique direct du VHD reste controversé.

L'échographie est un moyen d'exploration essentiel qui a permis l'orientation du diagnostic du CHC et la répartition des lésions hépatiques observées en deux entités différentes : les masses (69%) et les nodules uniques ou multiples de taille variable (31%). Elle doit cependant s'intégrer aux autres examens spécifiques telle que la cytologie qui reste l'examen de certitude de diagnostic d'un CHC car, le dosage de l'AFP en situation de diagnostic est insuffisant d'autant que chez 12% de patients dont le CHC a été confirmé par les examens cytologiques, l'AFP n'était pas sécrétée. Par ailleurs l'échographie a aussi ses limites même si ici, la confusion d'un CHC avec un abcès de foie ne représentait qu'un cas. De plus, la pratique de la cytoponction, même si elle est échoguidée, nécessite une certaine expérience de l'opérateur.

La RCA est située en zone tropicale où, le climat chaud et humide remplit les conditions idéales de synthèse des aflatoxines par les *Aspergillus* ; aussi le risque de survenue des CHC lié à l'infection par le VHB et l'exposition à l'AFB1 doit être pris en compte (**Ross et al., 1992; Chen et al., 1996 ; Buendia et al., 2000**).

CHAPITRE 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le VHB est un virus ubiquitaire mais la répartition selon les génotypes est très variable dans le monde. Nous avons obtenu pour la première fois des séquences nucléotidiques complètes du génome des VHB isolés en RCA. La majorité des souches du VHB provenant d'Afrique subsaharienne appartiennent au génotype E. Ce génotype s'étend de l'Afrique Occidentale à l'Afrique Centrale mais est nettement prédominant en RCA. Ce travail contribue donc à compléter la cartographie des génotypes africains du VHB (Figure 30). La multiplication des déterminations des séquences génomiques de ce virus permettent de mieux connaître sa phylogénie et peut être de déterminer si son évolution est parallèle à celle de l'homme et pour le génotype E quelle est l'origine géographique de ce virus sans doute plus récemment introduit dans l'espèce humaine. Il reste pour ce dernier à tenter de comprendre comment il a pu se répandre aussi facilement dans une population qui devait certainement déjà être infectée par un autre génotype de VHB.

La banque de sérum et de prélèvements de lésions de CHC par cytoponction que nous avons constituée à partir de la 2^{ème} population de cette étude nous permettra, par la suite, d'étudier la variabilité du gène X des VHB isolés chez ces patients (**Venard et al., 2000**). Il nous sera possible de comparer les souches circulantes et celles présentes *in situ* et de déterminer s'il existe des différences selon qu'ils sont atteints d'hépatite chronique (sans tumeur) ou de CHC. Une intégration du génome viral dans celui des hépatocytes tumoraux pourra également être envisagée.

La forte prévalence de l'infection par le VHB en RCA a amené, depuis 1992, l'OMS à recommander l'introduction de la vaccination contre le VHB dans le programme élargi de vaccination (PEV) quelque soit le statut de l'infection par le VHB dans le pays

(WHO, 1992). A Taiwan, les résultats obtenus après une combinaison de vaccination de routine chez les enfants et une dose de rappel chez les préadolescents, a montré que la prévalence de l'infection chronique par le VHB a chuté de 10 % à 0,7 % (une baisse de 93 %) parmi les enfants de moins de 15 ans et de la même façon, une réduction de CHC de 50 % a été observée parmi les enfants taiwanais âgés de 6 à 14 ans.

La vaccination systématique de la population centrafricaine apparaît comme le seul moyen efficace de faire baisser la prévalence de l'infection par le VHB et l'incidence du CHC. Il est évident que le coût d'une telle politique ne permet pas à l'heure actuelle son application cependant la vaccination doit être introduite dans le PEV dès le début de l'année prochaine. Le programme n'inclut pas le dépistage systématique chez les femmes enceintes seul moyen de prévenir une transmission périnatale.

REFERENCES

Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, and Condreay LD (1998). Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology*. **27**: 1670-1677.

Andrade ZA, Lesborde JL, Ravisse P, Parana R, Prata A, Barberino JS, and Trepo C (1992). Fulminant hepatitis with microvascular steatosis (a histologic comparison of cases occurring in Brazil –Labrea hepatitis– and in Central Africa–Bangui hepatitis). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **25** : 155.160.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Visoná KA, Magnius LO (1997). Genotype F prevails in HBV patients of Hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. *J. Med. Virol.* **51** : 305-312.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO (2002). Genotype H : a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.* **83** : 2059-2073.

Ascherio A, Zhang SM, Hernan MA, Olek Mj, Coplan PM, Brodovicz K, Walker AM (2001). Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **344** :327-332.

Bancroft WH, Mundon FK, Russel PK (1972). Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J. Immunol.* **109** :842-848.

Baumert TF, Rogers SA, Hasegawn K, Liang TJ. (1996). Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J. Clin. Investig.* **98** :2268-2276.

Benhamou Y, Dahin E, Lunel-Fabiani F, Poynard T, Huraux JM, Katlama C, Opolon P, and Gentilini M (1995). Efficacy of lamivudine on replication of hepatitis B virus in HIV-infected patients. *Lancet* **345** : 396-397.

Beasley RP, Trepo C, Stevens CE, and Szmunness W (1977). The “e” antigen and vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Am. J. Epidemiol.* **105**: 94 - 98.

Beasley RP, Lin CC, Hwang LY, and Chien CS (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus : a prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **II** :1129-1133.

Blumberg BS, Alter HJ, Vinisch S (1965). A “new” antigen in leukaemia sera. *J. Amer. Med. Assoc.* **191** :541-546.

Bowyer SM, Van Staden L, Kew MC, Sim JGM (1997). A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *J. Gen. Virol.* **78**:1719-1729.

Bowyer SM and Sim JG (2000). Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates. *J. Gen. Virol.* **81** :379-392.

Breiner KM, Urban S, Schaller H (1998). Carboxypeptidase D (gp 180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J. Virol.* **72** : 8098-80104.

Brunetto MR, Giarin M, Saracco G, Oliveri F, Calvo P, Capra G, Randone A, Abate ML, Manzini P, and Capalbo M (1993). Hepatitis B virus unable to secrete “e” antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **105** (3):845-850.

Bruss V and Ganem D (1991).The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **88** :1059-1063.

Bruss V, Ganem E, Vieluf K, Wunderlich G (1996). Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* **39** : 23-31.

Buendia MA (2000). Semin Genetics of hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol.***10** (3) : 185-200.

Bureau Central du Recensement (BCR) (2003). République Centrafricaine : Synthèse des résultats du recensement général de la population et de l’habitation. Décembre 2003, Bangui : Ministère de l’Economie, du Plan et de la Coopération Internationale. 51p

Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzy E, Zuckerman AJ, Thomas HC (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* **336** : 325-329.

Chang SF, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, Frölich K and Will H (1999). A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology.* **262**:39-54.

Chang TT, Gish R, De Man R, Gadano A, Sollano J, Chao YC, Lok AS, Han KH, Goodman Z, Zhu J, Cross A, DeHertogh D, Wilber R, Colonna R, Apelian D. (2006). A comparison of Entecavir and lamivudine for HBe Ag-positive chronic hepatitis B. *N Engl J. Med.* **354**: 1001-1010.

Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P and Galibert F (1979). Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBs Ag). *Nucleic Acids Res* **7** : 335-346.

Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, and Kumada H (1998). Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology*. **27**: 1711-1716.

Chen BF, Chen PJ, Jow GM, Sablon E, Liu CJ, Chen DS, and Kao JH (2004). High prevalence of mixed genotype infections in hepatitis B virus infected intravenous drug users. *J Med Virol*.**74** : 536-542.

Chen CJ, Wang LY, Lu SN, Wu MH, You SL, Zhang YJ, Wang LW, and Santella RM (1996). Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma *Hepatology*.**24**: 38-42.

Chen CJ, Yu MW, and Liaw YF (1997b). Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. **12**(9-10): S294-308.

Chirillo P, Pagano S, Natoli G, Puri PL, Burgio VL, Balsano C, Levrero (1997). The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc. Nat. Acad Sci*. **94** :8162-8167.

Confavreux C, Suissa S, Saddier P, Bourdes V, Vukusic S. For the Vaccination in Multiple Study Group (2001). Vaccinations and the risk of relapse in multiple sclerosis. *Engl J Med*. **344** :319-326.

Courouce AM and Pillonel J (1996). Estimation of risk of virus transmission in hepatitis B and C and human retrovirus via transfusion of labile blood derivatives. *Transfus. Clin. Biol.* **3** : 13-18.

Cui C, Shi J, Hui L, Xi H, Zhuoma, Quni, Tsedan, Hu G (2002). The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J Gen Virol.***83** :2773-2777.

Dane DS, Cameron CH and Briggs M (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**(7649) : 695-698.

De Franchis R, Hadengue A, Lau G, Lavanchy D, Lok A, McIntyre N, Mele A, Paumgartner G, Pietrangelo A, Rodes J, Rosenberg W, Valla D, and EASL Jury (2003). EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version). *J.Hepatol.* **39** (Suppl 1) : S3-S25.

Degos F, Marcellin P, and Benhamou JP (1988). Treatment of chronic active hepatitis caused by hepatitis B virus infection. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **12** (11): 845-854.

Dejean A, Lugassy C, Zafrani S, Tiollais P, and Brechot C (1984). Detection of Hepatitis B Virus DNA in Pancreas, Kidney and Skin of Two Human Carriers of the Virus. *J. Gen. Virol.***65** : 651 - 655.

Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, and Schiff ER (2003). Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* **124** :105-117.

Doerr HW, Gerlich WH. Medizinische Virologie Verlag : Thieme Stuttgart, 2002

Edmunds WJ, Medley GF, Nokes DJ, O'Callaghan CJ, Whittle HC, and Hall AJ (1996). Epidemiological patterns of hepatitis B virus (HBV) in endemic areas. *Epidemiol Infect.* **117**: 313-325.

Farci P, Roskams T, Chessa L, Peddis G, Mazzoleni AP, Scioscia R, Serra G, Lai ME, Loy M, Caruso L, Desmet V, Purcell RH, and Balestrieri A (2004). Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology.* **126**: 1740-1749.

Farci P, Mandas A, Coiana A, Lai ME, Desmet V, Eyken PV, Gibo Y, Caruso L, Scaccabarozzi S, Criscuolo D, Ryff JCh, and Balestrieri A (1994). Treatment of chronic hepatitis D with interferon alpha-2a. *N. Engl. J. Med.* **330** :88-94.

Fattovich G (2003). Natural history and prognosis of hepatitis B. *Seminars in Liver Disease* **23** : 47-58.

Fiume L, Cerenzia MR, Bonino F, Busi C, Mattioli A, Brunetto MR, Chiaberge E, and Verme G (1988). Inhibition of hepatitis B virus replication by vidarabine monophosphate conjugated with lactosaminated serum albumin. *Lancet* **II** : 13-15.

Flodgren E, Bengtsson S, Knutsson M, Strebkova EA, Kidd AH, Alexeyev OA, and Kidd-Ljunggren (2000). Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3311-3316.

Fujii H, Moriyama K, Sakamoto N, Kondo T, Yasuda K, Hiraizumi Y, Yamazaki M, Sakaki Y, Okochi K, Nakajima E. (1992). Gly¹⁴⁵ to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 1152-1157.

Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Kato T, Sugihara K, Hasegawa I, Sakurai M, Ito K, Ozasa A, Sakamoto Y, Arita I, El-Gohary A, Benoit A, Ooundele-Akplogan SI, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M (2005). Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin : phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E. *World J. Gastroenterol.* **11** : 6410-6415.

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature.* **281**:646-650.

Ganne-Carrie N, Williams V, Kaddouri H, Trinchet JC, Dziri-Mendil S, Alloui C, Hawajri NA, Deny P, Beaugrand M, Gordien E (2006). Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *J Med Virol.* **78** :335-340.

Gerlich WH, Lu X, and Heermann KH (1993). Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **17** (Suppl. 3) :S10-S14.

Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop EV, Valerius KP, Gerlich WH (2003). Pre-S1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J. Virol.* **77**(17) : 9511-9521.

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C and Guguen-Guillouzo C (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99**: 15655-15660.

Günther S, Fischer L, Pult I, Sterneck M and Will H (1999). Natural occurring variants of hepatitis B virus. *Adv. Virus. Res.* **52** : 25-137.

Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL. The Adefovir dipivoxil 438 study group (2003). Adefovir Dipivoxil for the Treatment of Hepatitis B e Antigen–Negative Chronic Hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **348** : 800 - 807.

Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, Arterburn S, Xiong S, Currie G, Brosgart CL. The Adefovir dipivoxil 438 study group (2005). Long-term therapy with adefovir dipivoxyl for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **352** : 2673-2681.

Hannoun C, Norder H, Lindh M (2000). An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J. Gen. Virol.* **81**:2267-2272.

Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P and Lindh M (2002). Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J. Infect. Dis.* **186**:752-759.

Hannoun C, Soderstrom A, Norkrans G, Lindh M (2005). Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol.* **86**:2163-2167.

Harrison TJ, Hopes EA, Oon CJ, Zanetti AR, Zuckerman AJ. (1991). Independent emergence of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **13** : S105-S107.

Hu, X. L., H. S. Margolis, R. H. Purcell, J. Ebert, and B. H. Robertson (2000). Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** :1661–1664.

Hughson FM (1995). Structural characterization of viral fusion proteins. *Current Biol.* **5** : 265-274.

Huy TT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K (2006). Characteristics of hepatitis B virus in Ghana : full length genome sequences indicate the endemicity of genotype E in West Africa. *J. Med. Virol.* **78** :178-184.

Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, De Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW (2005): HBV 99-01 Study Group, and Rotterdam Foundation for Liver Research. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B : a randomised trial. *Lancet.* **365**: 123-129.

Kann M, Bischof A and Gerlich WH (1997). In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J. Virol.* **71**: 1310-1316.

Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY and Chen DS (2000). Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J. Hepatol.* **33**:998-1002.

Kao HJ, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. (2002). Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1207-1209.

Kato H, Orito E, Gish, RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, and Mizokami M (2002). Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J. Virol.* **76**:6131-6137.

Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, and Kidd AH (2002). Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol.* **83**: 1267-1280.

Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G (1991). HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* **351** : 317-320.

Kimbi GC, Kramvis A, Kew MC (2004). Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *J. Gen. Virol.* **85**:1211-1220.

Koibuchi T, Hitani A, Nakamura T, Nojiri N, Nakajima K, Jyuji T, Iwamoto A (2001). Predominance of genotype A HBV in an HBV-HIV-1 dually positive population compared with an HIV-1-negative counterpart in Japan. *J. Med. Virol.* **64**:435-440.

Korenman J, Baker B, Waggoner J, Everhart JE, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH (1991). Long-term remission of chronic hepatitis B after alpha-interferon therapy. *Ann. Intern. Med.* **114**: 629-634.

Kramvis A, Weitzmann L, Owiredo WK, Kew MC (2002). Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J. Gen. Virol.***83** :835-839.

Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, Zekeng L, Ndembi N, Ngansop C, Kaptue L, Miura T, Ido E, Hayami M, Ichimura H, Mizokami M (2005). A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol.* **86**:2047-2056.

Kuroki K, Cheung P, Marion L, and Ganem D (1994). A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. *J. Virol.* **68**:2091-2096.

Kuroki K, Eng F, Ishikawa T, Turck C, Harada F, and Ganem D (1995). gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.* **270**:15022-15028.

Lacombe K, Gozlan J, Boelle PY, Serfaty L, Zoulim F, Valleron AJ, and Girard PM (2005). Long-term hepatitis B virus dynamics in HIV-hepatitis B virus-co-infected patients treated with tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS* **19**: 907-915.

Lai CL, Ching CK, Tung AK, Li E, Young J, Hill A, Wong BC, Dent J and Wu PC (1997). Lamivudine is effective in suppressing hepatitis B virus DNA in Chinese hepatitis B surface antigen carriers : a placebo-controlled trial. *Hepatology* **25** : 241-244.

Lai CL, Shouval D, Lok AS, Chang TT, Cheinquer H, Goodman Z, DeHertogh D, Wilber R, Zink RC, Cross A, Colonna R, Fernandes L (2006). BEHoLD AI463027 Study Group. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.***354** :1011-1020.

Lau DT, Doo E, Park Y, Kleiner DE, Schmid P, Kuhns MC, and Hoofnagle JH (1999). Lamivudine for chronic delta virus infection. *Hepatology.***30** : 546-549.

Le Bouvier GL (1971). The heterogeneity of Australia antigen. *J. Infect. Dis.* **123** :671-675.

LeFrère JJ. Les virus transmissibles par le sang. Editions John Libbey Eurotext, **1996**.

Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, T Tanwandee, QM Tao, K Shue, ON Keene, JS Dixon, DF Gray, J Sabbat (2004). Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N. Engl. J. Med.* **351**:1521-1531.

Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G and Horal P (1999). Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis.* **179**:775-7821.

Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B (2001): Summary of a workshop. *Gastroenterology* **120**:1828-1853.

Lu X (2004). Block Timothy. Study of the early steps of the hepatitis B virus life cycle. *Int. J. Med. Sci.* **1**: 21-33.

Magnius LO and Norder H. (1995). Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* **38**:24-34.

Makuwa M, Souquiere S, Telfer P, Apetrei C, Vray M, Bedjabaga I, Mouinga-Ondeme A, Onanga R, Marx PA, Kazanji M, Roques P, Simon F (2006). Identification of hepatitis B virus subgenotype A3 in rural Gabon. *J Med Virol* **78**:1175-1184.

« **Mammette A.** » : *Virologie Médicale*, Collection AZAY, Presses Universitaires de Lyon, 2002. p 562.

Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL. The Adefovir Dipivoxil 437 Study Group (2003). Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **348**:808-816.

Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Button P, Pluck N (2004). Peginterferon alfa-2a HBe Ag-negative chronic hepatitis B study group. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **351**: 1206-1217.

Marion PL, Oshiro L S, Regnery DC, Scullard GH and W. S. Robinson (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci. USA* **77**: 2941-2945.

Martinson FEA, Weigle KA, Royce RA, Weber DJ, Suchindran CM, and Lemon SM (1998). Risk Factors for Horizontal Transmission of Hepatitis B Virus in a Rural District in Ghana. *Am. J. Epidemiol.* **47**: 478 - 487.

Mason, W. S., G. Seal and J. Summers (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* **36**: 829-836.

Mathet VL, Cuestas ML, Ruiz V, Minassian ML, Rivero C, Trinkis J, Daleoso G, Leon LM, Sala A, Libellara B, Corach D, Oubina JR (2006). Detection of hepatitis B virus (HBV) genotype E carried even in the presence of high titers of anti-HBs antibodies by an Argentinean patient of African descent who had received vaccination against HBV. *J. Clin. Microbiol.***44**:3435-3439.

Maupas P, Goudeau A, coursaget P, Drucker J and Bagros P (1976). Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet* **I**: 1367-1370.

Mayerat C, Mantegani A and Frei PC (1999). Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J. Viral. Hepat.***6**:299-304.

Mulders MN, Venard V, Njayou M, Edorh AP, Bola Oyefolu AO, Kehinde MO, Muyembe Tamfum JJ, Nebie YK, Maiga I, Ammerlaan W, Fack F, Omilabu SA, Le Faou A, Muller CP (2004). Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis.***190**:400-408.

Murakami Y, K Saigo, H Takashima, M Minami, T Okanoue, C Bréchet, and P Paterlini-Bréchet (2005). Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* **54**: 1162 - 1168.

Nassal M., Junker-Niepmann M and Schaller H (1990). Translational inactivation of RNA function : discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid assembly. *Cell* **63**: 1357-1363.

Niederau K, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L, Häussinger G (1996). Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **334**:1422-1427.

Niesters H, Honkoop P, Haagsma E, Man R, Schalm S, Osterhaus A (1998). Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudine treatment. *J Infect Dis.* **117**: 1383-1385.

Norder H, Couroucé AM, Magnius LO (1992). Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol.***73**:3141-3145.

Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Couroucé AM, Mushahwar IK, Magnius LO (1993). Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J. Gen. Virol.* **74**: 1341-1348.

Norder H, Couroucé AM, Magnius LO (1994). Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* **198** : 489-503.

Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO (2004). Genetic diversity of hepatitis B virus

strains derived worldwide : genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* **47**:289-309.

Odemuyiwa SO, Mulders MN, Oyedele OI, Ola SO, Odaibo GN, Olaleye DO, Muller CP (2001). Phylogenetic analysis of new hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol.***65**:463-469.

Olinger CM, Venard V, Njayou M, Oyefolu AO, Maiga I, Kemp AJ, Omilabu SA, le Faou A, Muller CP (2006). Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa : new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol.***87**:1163-1173.

Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M (1987). Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J.Virol.***61**: 3030-3040.

Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, Matsui A, Miyazaki H, Yamamoto K, Tsuda F, Machida A, Mishihiro S (1992). Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. *Pediatr. Res.* **32**:264-268.

Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, Okita K, Okanoue T, Iino S, Tanaka E, Suzuki K, Watanabe H, Hige S, and Mizokami M (2001). Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology.* **34**: 590-594.

Paran N, Geiger B, and Shaul Y (2001). HBV infection of cell culture : evidence for multivalent and cooperative attachment. *EMBO J.***20**: 4443-4453.

Pasek M., Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, Leadbetter G and Murray K (1979). Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* **282**: 575-579.

Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Bréchet C (1995). Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **21**:313-321.

Pawlotsky JM, Belec L, Gresenguet G, Deforges L, Bouvier M, Duval J, Dhumeaux D (1995). High prevalence of hepatitis B, C, and E markers in young sexually active adults from the Central African Republic. *J. Med. Virol.* **46**:269-272.

Perrillo RP, Regenstein FG, Peters MG, DeSchryver-Kecsckemeti K, Bodicky CJ, Campbell CR and Kuhns MC (1988). Prednisone withdrawal followed by recombinant alpha-Interferon in the treatment of chronic type B hepatitis. A randomized controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **109**: 95-100.

Perrillo RP, Schiff ER, Davis GL, Bodenheimer HC, Lindsay Jr K, Payne J, Dienstag JL, O'Brien C, Tamburro C, Jacobson IM and et al. (1990). A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **323**: 295-301.

Pontisso P, Ruvoletto MG, Gerlich WH, Heermann KH, Bardini R, Alberti A (1989). Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles. *Virology*.**173**: 522-530.

Prince AM. (1968). An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **60**: 814-821.

Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, and Verme G (1977). Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*. **18**: 997 - 1003.

Rizzetto M, Shih JW, and Gerin JL (1980). The hepatitis B virus-associated delta antigen: isolation from liver, development of solid-phase radioimmunoassays for delta antigen and anti- delta and partial characterization of delta antigen. *J. Immunol*. **125**: 318 - 324.

Ren X, Luo G, Xie Z, Zhou L, Kong X and Xu A (2006). Inhibition of multiple gene expression and virus replication of HBV by stable RNA interference in 2.2.15 cells. *J. Hepatol*. **44**: 663-670.

Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, Groopman JD, Gao YT, and Henderson BE (1992). Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet*. **339**: 943-946.

Rossner MT (1992). Review : Hepatitis B virus X-gene product : a promiscuous transcriptional activator. *J. Med. Virol*. **36**:101-117.

Schirmbeck R, Bohm W, Ando K, Chisari FV and Reimann J (1995). Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *J. Virol*. **69**: 5929-5934.

Seeger C, Mason WS (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **64**: 51-68.

Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Bréchet C (1999). Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene*. **18**:4848-4859.

Sitterlin D, Tiollais P, Transy C (2000). Le rôle de la protéine virale X dans le cycle infectieux des hépadnavirus de mammifères. *Virologie*. **4**:217-227.

Sprengel RE, Kaleta F and Will H (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol*. **62**: 3832-3839.

Sugauchi F, Mizokami M, Orito E, Ohno E, Kato H, Maki M, Suzuki H, Ojika K, Ueda R (2000). Hepatitis B virus infection among residents of a nursing home for the Elderly : seroepidemiological study and molecular evolutionary analysis. *J. Med. Virol*. **62**: 456-462

Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M (2002). Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J. Virol*.**76**:5985-5992.

Sugauchi F, Orito E, Kato H, Suzuki S, Kawakita S, Sakamoto Y, Fukushima K, Akiba T, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M (2003). Genotype, serotype, and phylogenetic characterization of the complete genome sequence of hepatitis B virus isolates from Malawian chronic carriers of the virus. *J. Med. Virol*.**69**:33-40.

Summers J, Smolec JM and Snyder R (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 4533-4537.

Stuyver L, De Grent S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R (2000). A new genotype of hepatitis B virus : complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.* **81**: 67-74.

Suzuki S, Sugauchi F, Orito E, Kato H, Usuda S, Siransy L, Arita I, Sakamoto Y, Yoshihara N, El-Gohary A, Ueda R, Mizokami M (2003). Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among HBV carriers in the Cote d'Ivoire: complete genome sequence and phylogenetic relatedness of HBV genotype E. *J. Med. Virol.* **69**:459-465.

Szmunn W (1978). Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus : evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.***24**:40-69.

Szmunn W (1979). Large-scale efficacy trials of hepatitis B vaccines in the USA : baseline data and protocols. *J Med Virol* **4**(4) : 327-340.

Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, Yoshizawa H, Mishiro S. (1995). The precore/core promoter mutant (T1762A 1764) of hepatitis B virus : clinical significance and easy method for detection. *J. Gen. Virol.* **76**:3159-3164.

Travaux de thèse de Médecine : Ndala Stella, Institut Pasteur de Bangui . (Année de soutenance : 2005 ; N° : 15 BGF).

Terradillos O, Billet O, Renard CA, Levy R, Molina T, Briand P, and Buendia MA (1997). The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene.* **14**: 395-404.

Thibault V, Benhamou Y, Seguret C, Bochet M, Katlama C, Bricaire F, Opolon P, Poynard T, and Agut H. Hepatitis B Virus (HBV). (1999). Mutations Associated with Resistance to Lamivudine in Patients Coinfected with HBV and Human Immunodeficiency Virus. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3013-3016.

Tiné F, Liberati A, Craxi A, Almasio P, Pagliaro L (1993). Interferon treatment in patients with chronic hepatitis B : a meta-analysis of the published literature. *J. Hepatol.* **18**: 154-162.

Tiollais P, Pourcel C and Dejean A (1985). The hepatitis B virus. *Nature* **317**: 489-495.

Tiollais P (2001). Le virus de l'hépatite B. Un exemple d'application médicale du génie génétique. *Ann. Biol. Clin.* **59**:173-175.

Tong S, Li J, Wands JR (1999). Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor. *J. Virol.* **73**: 8696-8702.

Van Geyt C, De Gent S, Rombout A, Wyseur A, Maertens G, Rossau R, Stuyver L. (1998). A line probe assay for hepatitis B virus genotypes. In *Therapy for viral hepatitis*, pp. 139-145. Edited by Schinazi RF, Sommadossi JP, Thomas HC. London, UK : International Medical Press.

Venard V, Corsaro D, Kajzer C, Bronowicki JP, Le Faou A (2000). Hepatitis B virus X gene variability in French-born patients with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *J. Med. Virol.* **62**: 177-184

Wang J, Chenivesse X, Henglein B, and Brechot C (1990). Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a human hepatocellular carcinoma. *Nature* **343**: 555-557.

Weber B (2005). Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene. *Expert Rev Mol Diagn.* **5**: 75-91.

Wei Y, Etiemble J, Fourel G, Vitvitski-Trepo L, Buendia MA (1995). Hepadnavirus integration generates virus-cell cotranscripts carrying 3' truncated X genes in human and woodchuck liver tumors. *J. Med. Virol.* **45**:82-90.

Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W (2000). High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J. Gen. Virol.* **81**:1165-1174.

Weiser B, Ganem D, Seeger C and Varmus HE (1983). Closed circular viral DNA and asymmetrical heterogeneous forms in livers from animals infected with ground squirrel hepatitis virus. *J. Virol.* **48**: 1-9.

World Health Organization (1992). Report of the fourteenth meeting of the Global Advisory Group of the Expanded Programme on Immunization. *Wkly Epidemiol Rec.* **3**:11-15.

World Health Organization (2002). Hepatitis B World Health Organization. Department of Communicable Diseases Surveillance Response.

WHO/CDS/CRS/LYO/2002.2:HepatitisB.

<http://www.who.int/emc-documents/hepatitis/docs/whocdsrlyo20022.pdf/>

Xiong X, Flores C, Yang H, Toole JJ and Gibbs CS (1998). Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology* **28**: 1669-1673.

Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. (1994). Naturally occurring escape mutant of hepatitis B

virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* **68**: 2671-2676.

Yen BTS (1996). Hepadnaviral X protein : review of recent progress. *J Biomed Sci.* **3**:20-30.

Zhevachevsky NG, Nomokonova NYu, Beklemishev AB, and Belov GF (2000). Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection : Diagnostic and epidemiological significance *J. Med. Virol.* **61**:433-438.

Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. (1994). Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J. Virol.* **68**:2026-2030.

Zoulim F (2004). Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res.* **64** : 1-15.

ANNEXES : PUBLICATIONS ET TRAVAUX

LISTE DES PUBLICATIONS

- **Bekondi C**, Olinger CM, Boua N, Talarmin A, Muller CP, Le Faou A and Venard V. Central African Republic is part of the West-African hepatitis B virus genotype E crescent. *J Clin Virol.* 2007. **40** (1): 31-37.
- **Bekondi C**, Olinger CM, Talarmin A, Boua N, Muller CP, Venard V and Le Faou A. Characterization of Hepatitis B virus strains from The Central African Republic: preliminary results. Accepté et sous presse dans *Pathologie Biologie*, Ref.: Ms. No. PATBIO-D-07-00146 (sous presse)
- **Bekondi C**, Bernede C, Passone N, Minssart P, Kamalo C, Mbolidi D and Germani Y. Primary and opportunistic pathogens associated with meningitis in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to Human Immunodeficiency Virus serostatus. *Int. J. Infect Dis.* 2006. **10**(5): 387-395.
- Mihaila-Amrouche L, **Bekondi C**, Kappe YC, Bouvet A, Bercion R. First reported cases of *Streptococcus pyogenes* meningitis in Central African Republic. *Med Trop (Mars).* 2006. **66**(1):87-89.
- Tuyet DT, Yassibanda S, Nguyen Thi PL, Koyenede MR, Gouali M, **Bekondi C**, Mazzi J, and Germani Y. Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 in Bangui and N’Goila, Central African Republic: A brief report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006. **75**: 513-515.
- Mossoro C, Glaziou P, Yassibanda S, Nguyen Thi PL, **Bekondi C**, Minssart P, Bernier C, Le Bouguéneq C, and Germani Y. Chronic Diarrhea, Hemorrhagic Colitis, and Hemolytic-Uremic Syndrome Associated with HEp-2 Adherent *Escherichia coli* in Adults Infected with Human Immunodeficiency Virus in Bangui, Central African Republic. *J. Clin. Microbiol.* 2002. **40**: 3086-3088.

LISTE DES ARTICLES SOUMIS POUR PUBLICATION

- Ndala S, Komas N, Gody JC, Béré A, Manirakiza A, **Bekondi C** and A Le Faou. Age of acquisition of Hepatitis B infection in children in a region of high prevalence.
Soumis à *Tropical Medicine and International Health*

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communication affichée:

- **RICAI 2007: 27^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse :**
Session virologie
6 –7 Décembre 2007, Palais des Congrès de Paris, Porte Maillot, France
Bekondi C, Mobima T, Ouavènè JO, Sénékian VP, Béré A, Finance C, and Le Faou A.
Clinical and biological features of patients with hepatocellular carcinoma in Bangui,
Central African Republic.

- **Colloque scientifique du Réseau International des Instituts Pasteur : « Cancer et agents infectieux, Rage, Venins »**
16 –17 Novembre 2005, Alger, Algérie
Bekondi C, Talarmin A, Yassibanda S, Boua N, Venard V, Le Faou A.
Epidémiologie des souches de virus de l'hépatite B circulant en République
Centrafricaine.

Communications orales:

- **RICAI 2007: 27^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse :**
Session VIH et autres viroses
6 – 7 Décembre 2007, Palais des Congrès de Paris, Porte Maillot, France
Bekondi C*, Mobima T, Ouavènè JO, Sénékian VP, Béré A, Finance C, and Le Faou
A.
Clinical and biological features of patients with hepatocellular carcinoma in Bangui,
Central African Republic.

- **1^{ère} Conférence sur les hépatites virales et la transfusion sanguine.**
Fédération Centrafricaine des Associations de Donneurs Bénévoles de Sang et le
Laboratoire des Hépatites virales de l'Institut Pasteur de Bangui
17 Mars 2007, Amphithéâtre Calmette, Institut Pasteur de Bangui, République
Centrafricaine
Bekondi C*. L'hépatite virale B : Sécurité des dons de sang et des produits dérivés.

- **7^{ème} Congrès national de la Société Française de Microbiologie : session virologie et virologie clinique**
Cité des congrès de Nantes : 29 Mai – 1^{er} Juin 2007, Nantes, France
Bekondi C*, Olinger CM, Talarmin A, Ouavene JO, Muller CP, Venard V, and Le Faou A.
Caractérisation des souches du virus de l'hépatite B circulant en République Centrafricaine.

- **11th Sar-Lor-Lux workshop on Virus Reseach**
10 Septembre 2007, Homburg, Allemagne
Bekondi C*, Mobima T, Ouavene JO, Senekian V, Finance C, and Le Faou A.
Clinical and biological features of patients with hepatocellular carcinoma in Bangui, Central African Republic.

- **RICAI 2006 : 26^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse**
7 – 8 Décembre 2006, Palais des Congès de Paris, Porte Maillot, France
Bekondi C, Olinger CM, Talarmin A, Boua N, Muller CP, Venard V, and **Le Faou A***.
Characterization of Hepatitis B virus strains from Central African Republic

- * **Speaker**

ENSEIGNEMENTS SUIVIS

- **Cours de Virologie Systématique**
10 Avril au 30 Juin 2006
DIU de Virologie systématique. Institut Pasteur de Paris / Université Paris 7 Denis Diderot, Mention bien

Résumé

La population du virus de l'hépatite B (VHB) a été classée en huit génotypes allant de A à H. Des études récentes ont montré que le génotype E du VHB (VHB/E) prédomine sur un vaste territoire allant du Sénégal à l'Angola. La République centrafricaine (RCA) est située en zone de forte endémie où la prévalence de l'infection chronique par le VHB est estimée à 15,4% chez les adultes.

Une étude menée chez 196 patients atteints d'hépatite B chronique a permis d'obtenir 66 séquences complètes ou partielles d'ADN des VHB. L'analyse phylogénétique a montré que 62 souches appartenaient au génotype E, une au génotype A1 et 3 au génotype D. Une souche était un recombinant des génotypes E/D. Comme dans la plupart des pays d'Afrique Sub-saharienne le génotype E du VHB prédomine nettement en RCA, avec une faible variabilité (1,67%) sur l'ensemble des souches du génotype E déjà décrites. Ces résultats sont en faveur d'une introduction récente du génotype E dans l'espèce humaine avec un essaimage rapide dans les populations concernées. Une origine simienne de ces souches est possible étant donné les identités de séquences entre l'ADN du VHB/E et l'ADN du VHB du chimpanzé.

La deuxième partie du travail est une étude clinique et biologique chez 68 patients hospitalisés pour une suspicion de carcinome hépatocellulaire (CHC). Tous les patients recrutés (100%) étaient infectés par le VHB. L'échographie a permis de confirmer un CHC chez 43 patients et la cytoponction a permis un diagnostic de certitude chez 14 malades. L'antigène HBs (AgHBs) était présent chez 10 de ces 43 patients et 7 sur ces 10 étaient co-infectés par le VHD. La moyenne du dosage de l'alpha-foetoprotéine était de 10394 UI/mL. Chez les 25 autres patients, 21 avaient de l'AgHBs, parmi ceux-ci 11 étaient co-infectés par le VHD. La moyenne du dosage de l'AFP était de 9 UI/mL. Le CHC est donc fréquent en RCA et les patients consultent à un stade terminal de la maladie. Ce travail confirme aussi la relation entre VHB et CHC en RCA. Le VHD est associé aux formes graves d'hépatite B chronique. Les prélèvements de sérum et de lésions hépatiques qui ont été obtenus permettront par la suite d'étudier la variabilité du gène X et ses relations avec le CHC.

Mots clés

République Centrafricaine ; Virus de l'hépatite B ; Génotype E ; Génotype A1 ; Génotype D ; Carcinome hépatocellulaire

Summary

Hepatitis B virus (HBV) strains have been classified into eight genotypes A to H. Recent studies have shown that the HBV genotype E (HBV/E) predominates in a vast crescent spanning from Senegal to Angola. The Central African Republic (CAR) is an endemic country for HBV infection and prevalence of chronic infection in adults is estimated to be about 15.4%.

A survey of 196 patients attending local hospital with symptoms of hepatitis has permitted to obtain 66 complete or partial sequences of HBV DNA. Phylogenetic analyses have shown that 62 strains belonged to Genotype E while one was of genotype A1, and three of genotype D. One strain presented a recombination between genotypes E and D. Genotype E is thus predominant in RCA as in most Sub-Saharan countries. The variability of strains is limited not only among CAR strains but when all strains isolated so far are compared (1.67 %), suggesting a recent introduction of HBV in the human species with a rapid expansion. A simian origin of the genotype E is possible considering the DNA sequence identities with chimpanzee HBV DNA.

The second part of this study is a clinical and biological survey of 68 patients attending the "Hôpital de l'Amitié" of Bangui for a suspicion of hepatocellular carcinoma (HCC). All the patients (100 %) have been infected by HBV. Echography confirmed the suspicion of HCC in 43 patients and cytopathology ascertained the diagnosis for 14 patients for whom cytoponction was feasible. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) was present in 10 of these 43 patients, of whom 7 were co-infected with HDV. The average level of alpha-fetoprotein (AFP) was 10394 UI/mL. For the 25 other patients, HBsAg was detected in 21 of whom 11 were co-infected with HDV. Low level of AFP was observed (mean: 9UI/mL). This study shows that HBV related HCC is common in the country and that patients come to hospital late in the evolution of this disease. This study also confirms the association between HBV and HCC in CAR. HDV is associated with severe symptoms of hepatitis B. Serum and HCC lesions samples will be used to study variability of X gene and its relation with HCC.

Key words

Central African Republic; Hepatitis B virus; genotype E; genotype A1; genotype D, Cellular hepatocarcinoma.