

TABLE DE MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	ii
DEDICACE	xix
REMERCIEMENTS	xx
LISTE DES ABREVIATIONS	xxii
LISTE DES FIGURES	xxiv
RESUME	xxviii
ABSTRACT.....	xxix
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1- PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE	2
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTEATURE	5
I. LE VIRUS DE L'HEPATITE B (VHB).....	6
I.1. Historique de la découverte du VHB	6
I.2. Taxonomie du VHB	6
I.3. Structure, Génome et protéines du VHB.....	7
I.3.1. Morphologie virale	7
I.3.2 La structure du virion	8
I.3.3. Propriétés physico-chimiques du VHB	9
I.3.4. Organisation génomique du VHB	9
I.3.4.1. Les Cadres Ouverts de Lecture (COL)	11
I.3.4.2. Les séquences régulatrices	12
I.3.4.3. Les éléments structuraux.....	12
I.3.5. Structure et fonction des protéines virales.....	13
I.3.5.1. La polymérase virale.....	13
I.3.5.2. Les protéines d'enveloppe ou de surface	14
I.3.5.3. Les protéines de la capsid et la protéine précore.....	16
I.3.5.4. La protéine X	17
I.4. Le cycle de multiplication du VHB.....	18
I.4.1. Tropisme cellulaire	18
I.4.2.La réplication virale.....	18
I.4.2.1. Les étapes précoces du cycle de multiplication	19
I.4.2.2. La synthèse des protéines virales	20
I.4.2.3. La réplication du génome viral	20

I.4.2.4. Assemblage et la sortie des particules.....	20
I.5. La variabilité génétique du virus de l'hépatite B	20
I.5.1. La variabilité génomique du virus de l'hépatite B	21
I.5.1.1. Les sérotypes du virus de l'hépatite B	21
I.5.1.2. Les génotypes et sous génotypes du virus de l'hépatite B.....	23
I.5.1.3. Répartition géographique des génotypes du virus de l'hépatite B dans le monde	24
I.5.1.4. Infection multiple et recombinaison des virus de l'hépatite B.....	25
I.5.1.5. Pathogénicité des génotypes	25
I.5.2. La variabilité phénotypique du VHB.....	26
I.5.2.1. Les mutations Pré-S1 et Pré-S2 et la toxicité cellulaire.....	26
I.5.2.2. Les mutations du gène S : échappements vaccinaux et diagnostic.....	26
I.5.2.3. Les mutations dans le promoteur basal du core et sévérité de la maladie hépatique	28
I.5.2.5. Les mutations du gène X et le carcinome hépatocellulaire (HCC	29
I.5.2.6. Les mutations du gène de la Polymérase et résistance aux antiviraux (Figure 11).....	30
I.6. Diagnostic virologique de l'infection par le virus de l'hépatite B	31
I.6.1. Le diagnostic sérologique	31
I.6.1.1. Le système HBs	31
I.6.1.2. Le système HBc	32
I.6.1.3. Le système HBe	32
I.6.2. Les techniques de diagnostic moléculaire du virus de l'hépatite B.....	32
I.6.2.1. Techniques de détection et de quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B	33
I.6.2.2. Techniques de détection des variants du virus de l'hépatite B	33
I.6.2.3. Recherche des variants S	34
I.6.2.4. La recherche des variants précore.....	34
I.6.2.5. La recherche des variants dans la polymérase	35
I.6.2.6. Recherche des formes persistantes de l'ADN du virus de l'hépatite B	35
II.6.3. Les méthodes de génération d'arbres phylogénétiques	36
I.6.4. L'évaluation statistique de la robustesse des arbres phylogénétiques	38
I.7. Epidémiologie et prévention des hépatites B	38
I.7.1. L'infection par le VHB au Cameroun	39

I.7.1.2. Prévalence du VHB dans les populations humaines du Cameroun	39
I.7.1.3. Diversité génétique du VHB dans les populations humaines du Cameroun	41
I.7.1.4. Prévalence du VHB chez les primates non humains (PNH) du Cameroun	42
I.7.1.5. Diversité génétique du VHB chez les PNH au Cameroun	43
I.7.1.6. Transmission inter-espèces du VHB entre humains et PNH	44
I.7.2. Les principaux modes de transmission du virus de l'hépatite B	44
I.8. Physiopathologie de l'infection par le virus de l'hépatite B	46
I.8.1 Immunopathologie et mécanisme d'élimination virale	46
I.8.2 Mécanismes de la persistance virale	48
I.8.2.1. Les facteurs propres à l'hôte	48
I.8.2.2. Facteurs viraux	48
I.9. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B	50
I.9.1. Hépatite aiguë	50
I.9.2. Hépatite chronique	50
I.9.2.1. La phase d'immunotolérance	51
I.9.2.2. La phase de clairance immune	51
I.9.2.3. La phase de rémission ou phase d'équilibre	51
I.9.2.4. La phase d'élimination de l'antigène HBs	52
I.9.3. Carcinome hépatocellulaire (CHC)	52
I.10. Traitements des hépatites B chroniques	53
I.10.1. Les interférons	54
I.10.2. Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques	54
I.11. Prévention des infections à VHB	55
II. LE VIRUS DE L'HEPATITE DELTA (VHD)	56
II.1. Caractéristiques du virus	56
II.1.1. Structure	56
II.1.2. Génome	56
II.1.3. Variabilité génétique du virus de l'hépatite D	57
II.1.5. Les Protéines virales	59
II.1.6. La Multiplication du VHD	59
II.2. Pouvoir pathogène du VHD	61
II.3. Co-infection	62
II.4. Surinfection	63
II.5. Virus de l'hépatite D et carcinome hépatocellulaire	63

II.6. Epidémiologie de l'infection par le virus de l'hépatite D.....	63
II.6.1. Infection par le VHD au Cameroun	64
II.6.1.1.. Séroprévalence du VHD au Cameroun	64
II.6.1.2. Diversité génétique du virus de l'hépatite delta au Cameroun.....	64
II.7. Le diagnostic virologique de l'infection par le virus de l'hépatite D	65
II.7.1. Le diagnostic direct	65
II.7.2. Diagnostic indirect	65
II.8. Traitement et prévention de l'hépatite delta	66
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	67
II. POPULATIONS ETUDIEES	68
II.1. Population humaine	68
II.1.1. Les porteurs chroniques VHB	68
II.1.2. Les pygmées	68
II.2. Populations des primates non humains (PNH)	69
II.3. Considérations éthiques	70
II.4 Matériel biologique	70
II.4.1. Type de matériel biologique utilisé	70
II.4.2 Technique de collecte et de traitement des échantillons biologiques.....	71
II.5 Techniques de diagnostic sérologique des infections par le VHB et le VHD	72
II.5.1. Techniques de diagnostic sérologique de l'infection par le VHB.....	72
II.5.2. Techniques de diagnostic sérologique de l'infection par le VHD.....	73
II.6. Techniques de diagnostic moléculaire des infections par le VHB.....	75
II.6.1. Extraction de l'ADN du VHB	75
II.6.1.1. Extraction automatisée de l'ADN du VHB :	75
II.6.1.2. Extraction manuelle de l'ADN du VHB :	76
II.6.2. Détection quantitative de l'ADN plasmatique du VHB.....	77
II.6.3. Détection qualitative de l'ADN du VHB	78
II.7. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE L'INFECTION PAR LE VHD.....	83
II.7.1. Extraction de l'ARN du VHD par le « QIAamp® Viral RNA mini Kit ».....	83
II.7.2. Détection qualitative de l'ARN du VHD	84
II.7.2.1. Retro-transcription de l'ARN du VHD	84
II.7.2.2. Amplification qualitative de l'ARN du VHD.....	85
II.7.3. Révélation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose.....	87

II.7.4 1. Purification des produits de PCR.....	88
II.7.4 2. Purification des produits de PCR.....	89
II.7.5. Séquençage des produits d'amplification purifiés.....	89
II.7.6. Analyses phylogénétiques des séquences obtenues	92
II.7.6.1 Mise en forme et alignement des séquences	92
II.7.6.2. Dessin et manipulation des arbres	93
II.7.7. Technique de recherche des mutations sur les gènes d'intérêt clinique du VHB ..	93
II.8 Analyses statistiques	94
CHAPITRE III:RESULTATS ET DISCUSSION	95
III.1 RESULTATS.....	96
III.1.1 Séroprévalence de l'AgHBs et des Ac anti-VHD chez les porteurs chroniques de VHB, pygmées et les PNH du Cameroun	96
III.1.1.1 Portage de l'AgHBs chez les porteurs chroniques de VHB et les pygmées ...	96
□ Distribution des charges virales VHB Chez les porteurs chroniques de VHB	96
III.1.1.2. Séroprévalence de l'AgHBs chez les PNH	97
III.1.1.3. Séroprévalence des Ac anti-VHD (anti delta).....	99
III.1.1.3.1. Séroprévalence des Ac anti-VHD (anti delta) chez les porteurs chroniques de VHB.....	99
III.1.1.3.2. Séroprévalence des Ac anti-VHD (anti delta) chez les pygmées.....	99
III.1.1.3.3. Séroprévalence des Ac anti-VHD (anti delta) chez les PNH	100
III.1.2. Diversité génétique du VHB et du VHD dans les populations humaines et simiennes du Cameroun.....	100
III.1.2.1. Diversité génétique du VHB dans les populations humaines	100
a) Détection qualitative des différents fragments de VHB	100
b) Distribution des génotypes et sous génotypes du VHB chez les porteurs chroniques du VHB	102
c) Chez les pygmées	105
III.2.2. Diversité génétique du VHB chez les PNH.....	108
a) Chez les grands singes chimpanzés et gorilles	108
b) Chez les petits singes de la famille des Cercopithecidae.....	111
III.1.2.3. Diversité génétique du VHD chez les populations humaines.....	114
a) Détection qualitative des différents fragments subgénomiques du VHD.....	114
b) Chez les Porteurs chroniques du VHB	115
c) Chez les pygmées	118

III.1.3. Etude des mutations spécifiques des VHB chez les populations humaines du Cameroun.....	121
III.1.3.1. Les séquences d'acides aminés de la protéine M du VHB des porteurs chroniques VHB et les pygmées	121
III.1.3.2. Distribution des sérotypes du VHB au sein des populations des porteurs chroniques VHB et des pygmées	123
III.1.3.3 Les séquences nucléotidiques Précore/core/BCP du VHB dans la population humaine du Cameroun	124
III.1.3.4. Distribution des mutations Précore/core/BCP dans les populations des porteurs chroniques VHB et pygmées du Cameroun	127
III.1.3.5. Mutations précore/core/BCP et production d'AgHBe du VHB	128
III.1.3.7. Les mutations d'échappement à la vaccination contre le VHB.....	130
III.1.3.8. Les mutations de résistance au traitement antiviral	130
III.1.3.9. Les mutations du gène X et le carcinome hépatocellulaire (CHC).....	130
III.1.3.10. Recherche des recombinaisons génétiques entre les souches de VHB des différentes populations étudiées.	131
a). Recherche des recombinaisons génétiques de VHB chez les pygmées	132
b). Recherche des recombinaisons génétiques de VHB chez les porteurs chroniques VHB	134
c). Recherche des recombinaisons génétiques de VHB chez les grands singes	139
d). Recherche des recombinaisons génétiques de VHB chez les petits singes	142
III.1.3.11. Recherche des recombinaisons génétiques du VHD chez les populations les porteurs chroniques VHB et les pygmées.....	145
III.1.3.12. Evaluation de la transmission inter-espece du VHB	148
III.2 DISCUSSION.....	149
CHAPITRE IV: CONCLUSION, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS	157
IV.3. RECOMMANDATIONS	160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161
ANNEXES.....	185

DEDICACE

A ma maman Mariatou, à mes enfants Amira, Ahmed, Malik, Anifa et à mon épouse Aicha.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Paul FEWOU MOUNDIPA :

Professeur des Universités

Je tiens une fois de plus à vous exprimer toute ma gratitude. Malgré toutes vos multiples occupations, vous avez accepté de superviser cette thèse. Votre générosité, votre ténacité et votre amour pour le travail bien accompli forcent mon admiration.

A Monsieur le Docteur Richard NJOUOM :

Chef du Service de Virologie au Centre Pasteur du Cameroun (CPC)

Directeur de thèse

Je tiens à vous remercier pour avoir accepté d'initier et de diriger cette thèse. Vous m'avez ainsi donné la chance de travailler dans un domaine qui m'intéresse. Vous êtes pour moi un maître et un guide dans ce prestigieux monde de recherche. Malgré toutes vos occupations, vous avez toujours su trouver du temps pour m'écouter et me donner des orientations nécessaires.

Aux enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I :

Je tiens à remercier tous les enseignants du département de Biochimie pour tout leur encadrement pendant ces longues années d'études. Qu'ils trouvent en l'aboutissement de ce travail l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Claude P. MULLER :

Professeur des Universités et Chef du Laboratoire National de la Santé, Luxembourg

Je tiens à vous remercier chaleureusement pour l'accueil à moi réservé au cours de mon séjour dans votre institution. Malgré vos multiples occupations, vous aviez toujours su trouver du temps pour vous intéresser à mon encadrement et demander comment se déroulait mon stage.

A Madame le Docteur Nina LUTEHE :

Je tiens à vous remercier pour m'avoir encadré durant le temps passé dans votre institution. Votre disponibilité et votre écoute m'ont marqué. Je souhaite pouvoir encore avoir l'occasion de travailler avec vous. Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe du Département d'Immunologie, du laboratoire National de Santé du Luxembourg pour leur aide précieuse dans la réalisation du génotypage et des analyses phylogénétiques de certaines des souches des virus de l'hépatite B et delta.

Aux Docteurs Eric NERRIENET, Dominique ROUSSET et Jean Marc REYNES :

Les anciens chefs de service de Virologie du Centre Pasteur du Cameroun

Vous avez tous contribué à la construction de cet édifice, veuillez recevoir cher(e)s Docteurs l'expression de mes sincères remerciements. Le parcours a été long assurément, mais mieux vaut tard que jamais.

A Monsieur le Docteur Ahidjo AYOUBA :

Je tiens à vous remercier pour vos conseils utiles surtout au moment où je voulais me décourager. J'ai apprécié votre dévouement et vos compétences dans le domaine de la recherche. Ces qualités m'ont inspiré et ont nourri mes rêves sur ce chemin ardu.

Je remercie également l'ensemble du personnel du CPC et l'équipe du Service de Virologie qui ont largement contribué à la réalisation de ce travail. Je remercie plus particulièrement le Parfait, Georgette, Viviane, Créscence et Marthe qui sont déjà parti prospecter des horizons nouveaux. Une pensée au feu Emmanuel et un merci à Bernadette, Daniel, Marie Claire, Jude, Maurice, Valérie, Laure, Frédéric, Robert, Cathy. Je remercie particulièrement toute l'équipe de Biologie moléculaire pour sa contribution à la réussite de ce travail.

A Monsieur Jermie MFOUPOUENDOUEN :

Tu as été plus qu'un collègue. Tu as puisé de tes expériences pour jouer auprès de moi un rôle de parent. Je souhaite que le Dieu tout puissant remette tout cela à ta progéniture. Je ne t'oublierai jamais. Trouves en l'accomplissement de ce travail le fruit de tes multiples conseils et encouragements.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des Médecins consultants et les patients qui ont accepté de participer à cette étude.

Que tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail, et dont je n'ai pas pu citer les noms, trouvent ici le témoignage de toute ma gratitude.

A mes Oncles et tantes.

A mes frères et sœurs.

A mes cousins et cousines.

A mes neveux et nièces.

A ma belle famille.

A mes amis.

LISTE DES ABREVIATIONS

Aa :	Acide aminé
Ac :	Anticorps
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNccc :	ADN circulaire covalamment clos
Ag :	Antigène
AgHBc :	Ag de la capsid («core») du virus de l'hépatite B
AgHBe :	Ag de l'enveloppe «e» du virus de l'hépatite B
AgHBs :	Antigène de surface du virus de l'hépatite B
AgHD :	Antigène de l'Hépatite Delta
ALAT :	Alanine aminotransférase
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 :	Aspartate aminotransférase
BCP :	<i>Basal Core promoter</i>
BET :	Bromure d'éthidium
CHC :	Carcinome hépatocellulaire
CPC :	Centre Pasteur du Cameroun
ChHBV :	<i>Chimpanzee Hepatitis B Virus</i>
CMH I :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
DHBV :	<i>Duck Hepatitis B Virus</i>
dNTPs :	Désoxynuléotides triphosphates (ATP, TTP, CTP, GTP)
EDTA:	Ethylene–Diamine–Tetra–Acetic acid
GiHBV :	<i>Gibbon Hepatitis B virus</i>
GoHBV :	<i>Gorilla Hepatitis B virus</i>
Gp :	Glycoprotéine
GSHBV :	<i>Ground Squirrel Hepatitis B Virus</i>
HBX :	Protéine X du virus de l'hépatite B

HHBV :	<i>Heron Hepatitis B virus</i>
HLA :	<i>Human Leucocyte antigen</i>
IFN α :	Interféron-alpha
IgHB :	Immunoglobulines spécifiques anti-HBs
IgM :	Immunoglobuline de type M
IgG :	Immunoglobuline de type G
Kb :	Kilobase
kDa :	Kilodalton
LHD :	<i>Large hepatitis D</i>
MgCl ₂ :	Chlorure de magnésium
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
ORF :	<i>Open Reading Frame</i>
OuHBV :	<i>Orang-outang Hepatitis B virus</i>
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNH :	Primate non humain
RE :	Réticulum endoplasmique
SGHBV :	<i>Snow Goose Hepatitis B virus</i>
sHD :	<i>small hepatitis D</i>
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
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WHBV :	<i>Woodchuck Hepatitis B Virus</i>
WMHBV :	<i>Wooly Monkey Hepatitis B Virus</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Phylogénie des Hepadnaviridae, (Edmunds <i>et al.</i> , 1996).....	7
Figure 2 : Photographie en microscopie électronique des particules virales.	8
Figure 3 : Structure du virus de l'hépatite B (Stephan Urban, 2010).....	9
Figure 4 : Structure et organisation génomique du VHB des mammifères.....	10
Figure 5 : Structure de signal d'encapsidation (Karin Kidd-Ljunggren, 2002)	13
Figure 6: Schéma de la région codant les trois protéines d'enveloppe	16
Figure 7 : Cycle de répliatif du VHB, (<i>Kay, 2004</i>)	19
Figure 8 : Epidémiologie et répartition des génotypes du VHB dans le monde. (Lavanchy, 2004)	24
Figure 9 : Principales mutations décrites sur le déterminant antigénique « a » de la protéine S. (Carman <i>et al.</i> , 1990).....	27
Figure 10 : Les gènes codant les protéines HBc et HBe et émergence des mutants pré-C.....	29
Figure 11 : Les mutations dans le gène polymérase et la résistance aux antiviraux.	31
Figure 12 : Principe des PCR permettant l'amplification sélective des cccDNA.	36
Figure 13 : Réponse cellulaire T cytotoxique.	47
Figure 14 : Les différentes formes du génome du VHD.	57
Figure 15 : Séroprévalence de l'infection à VHD et des génotypes prédominants dans le monde. Adapté (Shih <i>et al.</i> , 2010).	58
Figure 16 : Schéma de la particule delta et de son cycle de répliation. (Andrade <i>et al.</i> , 1992)	61
Figure 17: Localisations géographiques de trois grands groupes ethniques pygmées du Cameroun (Foupouapouognigni <i>et al.</i> , 2011)	69
Figure 18. Distribution des charges virales VHB en fonction du nombre de patients.	96
Figure 19 : Electrophorogrammes des différents fragments subgénomiques amplifiés du VHB	101
Figure 20 ; Relation phylogénétique des souches VHB des porteurs chroniques de VHB basé sur le gène Pol.	103
Figure 21 : Relation phylogénétique des souches VHB des porteurs chroniques VHB basée sur le génome complet.....	104
Figure 22 : Relations phylogénétiques entre les souches de VHB circulant dans les groupes ethniques pygmées du Cameroun.....	106
Figure 23 : Relation phylogénétique des VHB des Pygmées basée sur le génome complet.	107
Figure 24 ; Relation phylogénétique de VHB des grands singes basé sur le gène S.	109

Figure 25: Relation phylogénétique basée sur les séquences de génomes complets des VHB des grands singes.	110
Figure 26 : Relation phylogénétique des VHB des petits singes basée sur le gène S.....	112
Figure 27: Relation phylogénétique du génome complet de VHB du petit singe AKUM.....	113
Figure 28 : Electrophorégrammes des différents fragments subgénomiques amplifiés du VHD	114
Figure 29 : Arbre phylogénétique des souches VHD de porteurs chroniques VHB au niveau de la région R0.	116
Figure 30 : Relation phylogénétique de VHD des porteurs chroniques VHB au niveau du génome complet.	117
Figure 31 : Relation phylogénétique de VHD des pygmées au niveau de la région R0.	119
Figure 32 ; Relation phylogénétique de VHD des pygmées au niveau du génome complet.	120
Figure 33 : Séquences des acides aminés de la protéine M du VHB des porteurs chroniques VHB et Pygmées et les positions permettant de définir les sérotypes du VHB.	122
Figure 34: Fréquence de détection des sérotypes de VHB au sein des populations des porteurs chroniques VHB et des pygmées du Cameroun.	123
Figure 35 : Fréquence de détection des sérotypes de VHB en fonction des génotypes A et E du VHB.	124
Figure 36 : Séquences nucléotidiques du gène Précore du VHB des porteurs chroniques VHB et pygmées et les positions associées à des mutations ayant une conséquence clinique.....	125
Figure 37 : Séquences nucléotidiques du gène BCP du VHB des porteurs chroniques VHB et pygmées et la position associée à la mutation ayant une conséquence clinique.	126
Figure 38 : Fréquence de détection des différentes mutations du précore/Core et du promoteur basal du Core en fonction des génotypes A et E du VHB.....	127
Figure 39 : Distribution des valeurs de Charges virales VHB en fonction du phénotype AgHBe.....	128
Figure 40 : Fréquence de détection des mutations précore/core/BCP en fonction du statut AgHBe.III.1.3.6. Mutations précore/core/BCP et développement du carcinome hépatocellulaire	129
Figure 41 : Linéarisation des souches non recombinantes du VHB. Adapté de (Hai Y et al, 2010).....	132
Figure 42 : Relations phylogénétiques entre les séquences nucléotidiques des VHB des pygmées et les séquences de référence du VHB au niveau des fragments subgénomiques S, X et C.	133

Figure 43: Relations phylogénétiques des VHB des porteurs chroniques VHB au niveau des fragments subgénomiques S, X et C.	135
Figure 44 : Pourcentage d'arbres permutés et score de similarité (Simplot) des souches ABD, BON, MAF.....	136
Figure 45 : Score de similarité (Simplot) et pourcentage d'arbres permutés (Bootscan) des souches NDZ et YAC.....	137
Figure 46 : Score de similarité (Simplot) et pourcentage d'arbres permutés (Bootscan) des souches ASS.....	138
Figure 47: Score de similarité (Simplot) et pourcentage d'arbres permutés (Bootscan) des souches NAB.....	138
Figure 48 : Relations phylogénétiques des VHB des grands singes au niveau des fragments subgénomiques S, X et C.	140
Figure 49 : Pourcentage d'arbres permutés et score de similarité des souches présentant la recombinaison chez les chimpanzés.....	141
Figure 50 : Relations phylogénétiques entre les séquences nucléotidiques des VHB du petit singe AKUM et les séquences de référence du VHB au niveau des fragments subgénomiques S, C et X.	143
Figure 51 : Pourcentage d'arbres permutés et score de similarité des souches présentant la recombinaison chez le petit singe AKUM.	144
Figure 52 : Relations phylogénétiques entre les séquences nucléotidiques des VHD des porteurs chroniques VHB et pygmées et les séquences de référence du VHD au niveau des fragments subgénomiques A, B et C.....	146
Figure 53 : Pourcentage d'arbres permutés des souches présentant la recombinaison du VHD chez les Pygmées du Cameroun.	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des sérotypes du virus de l'hépatite B. : (Norder <i>et al.</i> , 1992; Okamoto <i>et al.</i> , 1987b).....	22
Tableau II : Séroprévalence du VHB au Cameroun.....	40
Tableau III : Séroprévalence du VHD au Cameroun.	64
Tableau IV : Répartition des échantillons des PNH en fonction des espèces.	71
Tableau V : Noms, séquences nucléotidiques, régions et positions sur le génome du VHB et température d'hybridation des amorces utilisées pour amplification des différents gènes du VHB.	80
Tableau VI : Régions des génomes du VHB amplifiées, noms des amorces utilisées, composition du mélange réactionnel et programmes d'amplification utilisés amplification des isolats du VHB au sein de chaque population étudiée.	81
Tableau VII : Stratégie d'amplification des fragments subgénomiques pour l'obtention du génome complet des VHB des populations humaines et des petits singes.(Starkman <i>et al.</i> , 2003).....	82
Tableau VIII : Stratégie d'amplification des fragments subgénomiques pour l'obtention du génome complet des VHB des populations des grands singes.....	82
Tableau IX : Régions amplifiées, noms et séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification du gène de l'antigène delta (R0) et les différents fragments subgénomiques des génomes complets du VHD.	85
Tableau X : Composition du milieu réactionnel et les programmes d'amplification du fragment R0 (Radjef <i>et al.</i> , 2004)	86
Tableau XI : Composition du milieu réactionnel et les programmes d'amplification des fragments subgénomiques pour obtention du génome complet du VHD.(Radjef <i>et al.</i> , 2004)86	
Tableau XII : Conditions de thermocyclage de l'amplification pour séquençage	91
Tableau XIII: Séroprévalence de l'AgHBs dans les groupes ethniques Pygmées (Baka, Bakola, Bedzam) du Cameroun en fonction des tranches d'âge.....	97
Tableau XIV : Séroprévalence de l'AgHBs chez les PNH du Cameroun.	98
Tableau XV : Séroprévalence de l'anticorps delta chez les porteurs chroniques du VHB du Cameroun.	99
Tableau XVI : Séroprévalence de l'anticorps delta chez les groupes ethniques pygmées du Cameroun.	100

RESUME

Les virus des hépatites B (VHB) et D (VHD) sont endémiques en Afrique subsaharienne avec cependant, peu d'informations disponibles sur leur origine, leur circulation et leur diversité génétique. Notre étude visait à déterminer la séroprévalence, étudier la diversité génétique et la transmission inter espèce des VHB et VHD au sein des populations pygmées, des porteurs chroniques VHB et des primates non humains (PNH) dont les grands singes et les petits singes du Cameroun.

Le dépistage de ces infections a été réalisé sur les plasmas en recherchant respectivement les antigènes de surface du VHB (AgHBs) et les anticorps dirigés contre l'antigène D (Ac AgD) par la technique « *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* » (ELISA). La diversité génétique et la transmission inter espèce ont été étudiées grâce aux techniques de « *Polymerase Chain Reaction* » (PCR), séquençage et analyses phylogénétiques des séquences nucléotidiques partielles et complètes.

Une séroprévalence de 11.8% du VHB a été trouvée chez les Pygmées. Pour le VHD, des taux de séroprévalences de 17.6% chez les porteurs chroniques VHB et 69.2% chez les pygmées ont été obtenus ; montrant une hyper endémicité des VHB et VHD au Cameroun. Une importante diversité génétique des VHB et VHD a été obtenue. Pour le VHB, des génotypes A et E ont été identifiés chez les pygmées et les porteurs chroniques VHB tandis que des souches recombinantes (AE) ont été identifiées uniquement chez les porteurs chroniques VHB. Pour le VHD, les génotypes 1, 4, 5 et 7 ont été identifiés chez les porteurs chroniques VHB et les génotypes 1, 7 et des souches recombinantes (1 et 7) chez les pygmées.

Chez les PNH, une séroprévalence globale de 5.2% a été obtenue pour le VHB. Les VHB typiquement simiens (gorilles, chimpanzés) et un virus recombinant entre les VHB infectant les sous-espèces de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* et *Pan troglodytes Vellerosus* ont été identifiés. Le génome complet VHB détecté chez un *Cercopithecus torquatus* s'est révélé être proche de celui des Chimpanzés. Certains VHB humains de génotype E et VHB identifiés chez les petits singes se sont regroupés au sein d'un même cluster. Ces résultats suggèrent une transmission du VHB entre les sous espèces, espèces des PNH et des humains.

Nos résultats montrent la complexité épidémiologique des infections par le VHB et le VHD au Cameroun liée probablement à l'endémicité, à la grande variabilité génétique, à la diversité des modes de transmission et d'évolution de ces virus au sein des populations humaines et simiennes. Des études supplémentaires permettant de comprendre la dynamique de transmission du VHB entre les humains et les petits singes sont indispensables.

Mots clés : Virus de l'Hépatite B, Virus de l'Hépatite Delta, Séroprévalence, Diversité génétique, Evolution, Cameroun.

ABSTRACT

Hepatitis B (HBV) and delta (HDV) viruses are endemic in sub-Saharan Africa. However, little information is available on their origin, circulation and genetic diversity. Our study aimed to determine the seroprevalence, study the genetic diversity and the genetic exchanges between these viruses, and assess the potential of cross-species transmission of HBV between humans (pygmy and HBV chronic carriers) and non human primates (NHP: great Apes and monkey) in Cameroon.

The diagnosis of HBV and HDV infection was carried out on plasma samples. Hepatitis B surface antigens (HBsAg) and HDV antibodies were sought by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technic. Partial and Complete nucleotide sequences of the genome were obtained after amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR), sequencing and phylogenetic analysis to study the genetic diversity and cross species transmission of HBV and HDV.

HBV seroprevalence among the pygmy was 11.8%. Seroprevalences of HDV obtained were 17.6% in the HBV chronic carriers and 69.2% in the pygmy. These results highlighted the hyper-endemic nature of HBV and HDV in Cameroon. A high genetic diversity of HBV and HDV was also observed in Cameroon. For HBV, genotypes A and E were found in Pygmy and HBV chronic carriers populations. While, recombinant forms between genotypes A and E were found only in HBV chronic carriers. For the HDV, genotypes 1, 4, 5 and 7 were found among the HBV chronic carriers and genotypes 1, 7 and recombinant forms (1 and 7) among the Pygmies.

A global seroprevalence of 5.2% was found for the HBV among NHP. The HBV genotypes identified were species specific (HBV of Chimpanzee and HBV of Gorillas). A recombinant HBV comprising the nucleotidic sequences of sub-species of chimpanzees *Pan troglodytes troglodytes* and *Pan troglodytes Vellerosus* was equally identified. The HBV detected in monkeys of the *Cercopithecus torquatus* species turned out to be closed to that of the chimpanzee, suggesting a cross species transmission of HBV between the NHP. Certain human HBV genotype E gathered with cercopithecidae HBV, suggesting a possible transmission of HBV between humans and monkeys.

Our findings suggest the epidemiologic complexity of HBV and HDV infections in Cameroon linked probably to the endemicity of these infections, the higher genetic diversity and diversity of transmission modes with the evolution of these viruses in the Human and simian populations. Further studies are needed to better understand the dynamic transmission between humans and monkeys.

Keywords: Hepatitis B virus, Hepatitis Delta virus, seroprevalence, genetic diversity evolution, Cameroon.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

En dépit de l'existence d'un vaccin efficace contre le virus de l'hépatite B (VHB), l'infection par le VHB demeure un problème mondial majeur de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2 milliards d'individus de part le monde ont été infectés par le VHB avec plus de 350 millions de porteurs d'hépatite chronique et environ un million de décès par an à travers le monde. L'hépatite B est une maladie le plus souvent bénigne, mais qui évolue chez 5 à 10 % des adultes immunocompétents vers une hépatite chronique (Kao *et al.*, 2010), et qui peut conduire au développement d'une cirrhose voire d'un carcinome hépatocellulaire. Environ 15 à 45% d'enfants infectés par le VHB développent une cirrhose et ou un carcinome hépatocellulaire (Fattovich *et al.*, 2008).

Appartenant à la famille des hepadnaviridae, le VHB est le plus petit virus à ADN infectant l'homme avec seulement 3200 nucléotides. C'est un virus enveloppé à ADN circulaire partiellement double brin ayant quatre cadres ouverts de lecture codant pour les gènes de surface, core, polymérase et X. Au cours de son cycle de réplication, il utilise une transcriptase inverse (polymérase virale) qui manque d'activité correctrice et qui par conséquent est à l'origine de la forte variabilité observée sur le génome du VHB. Son évolution au cours du temps a conduit à l'existence des différents génotypes, sous-génotypes, mutants, recombinants et éventuellement des quasi-espèces (Kao *et al.*, 2002; Kao, 2002; Liu *et al.*, 2002). Au total 10 génotypes de VHB (A-J) ont été décrits à ce jour avec une distribution géographique plus ou moins distincte (Phung *et al.*, 2010; Tatematsu *et al.*, 2009). Par définition, un nouveau génotype est identifié lorsqu'on a une divergence de plus de 8% sur la totalité du génome comparé aux génotypes déjà existants (Norder *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1987b). De plus en plus, des études établissent des relations de pathogénicité des génotypes du VHB dans la progression et l'évolution clinique de la maladie et la réponse thérapeutique (Kao *et al.*, 2010; Lin & Kao, 2011).

Par ailleurs, la complication de la maladie hépatique occasionnée par le VHB est plus accentuée dans le cadre de la coïnfection ou de la surinfection par le virus de l'hépatite delta

(VHD). Le VHD est le plus petit virus à ARN infectant l'homme. Il est semblable aux viroïdes des plantes et classé dans le genre *Deltavirus*. Le VHB est le virus helper du VHD car il ne peut se répliquer que chez un patient porteur du VHB (Barrera *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 1991; Rizzetto *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 1991).

En Afrique subsaharienne l'infection par le VHB est endémique. La prévalence des anticorps dirigés contre l'antigène du core est très élevée et celle des infections chroniques atteint souvent 15% (Lavanchy, 2004)

Le Cameroun est un pays à priori situé dans une zone de forte endémicité pour le VHB. Malgré l'absence d'étude de prévalence à portée nationale, les taux de prévalence variant de 6 à 90% (Kouanfack *et al.*, 2012; Mogtomo *et al.*, 2009; Mulders *et al.*, 2004; Poveda *et al.*, 1986) ont été rapportés suivant les populations étudiées. Les génotypes A et E co-circulent au Cameroun dans la population humaine (Hubschen *et al.*, 2011; Kouanfack *et al.*, 2012; Kurbanov *et al.*, 2005; Mulders *et al.*, 2004; Olinger *et al.*, 2006).

De plus, le Cameroun regorge d'un grand nombre de primates non humains (PNH). On y retrouve les grands singes (chimpanzés et gorilles) et une grande variété de petits singes de la famille des *cercopithecidae*. Ces PNH partagent le même environnement géographique avec les pygmées (groupe ethnique vivant de la chasse et de la cueillette) repartis dans les régions du Centre, du Sud et de l'Est.

1- PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE

L'analyse des données de la littérature sur la séroprévalence de l'infection à VHB effectuée au Cameroun (Chiaramonte *et al.*, 1991; Garrigue *et al.*, 1985; Mulders *et al.*, 2004; Ndumbe *et al.*, 1993; Zekeng & Kaptue, 1990) classe notre pays parmi ceux ayant une hyperendémicité selon l'Organisation Mondiale de la Santé (prévalence de l'AgHBs supérieure à 8%). Cependant, les résultats de ces études sont très divergents et varient selon les auteurs et les populations étudiées. La prévalence de l'infection par le VHB chez les pygmées a été déterminée uniquement chez les pygmées Baka (Kowo *et al.*, 1995; Kurbanov *et al.*, 2005; Ndumbe *et al.*,

1993) et aucune étude n'est disponible dans d'autres groupes ethniques pygmées du Cameroun. Peu de données sont disponibles sur l'épidémiologie clinique et moléculaire du VHB chez les PNH du Cameroun (Grethe *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 2000; Makuwa *et al.*, 2007a; Starkman *et al.*, 2003). Les données sur la distribution et la diversité génétique du VHB au Cameroun sont aussi parcellaires et divergentes (Hubschen *et al.*, 2011; Mulders *et al.*, 2004). Les études indiquent une circulation des génotypes A, E, des rares génotypes D, des formes recombinantes et des infections mixtes (Hubschen *et al.*, 2011; Kurbanov *et al.*, 2005). Une grande variabilité intragénotypique au sein des isolats Camerounais de génotype A a été rapportée. Les données de l'épidémiologie du VHD au Cameroun sont aussi parcellaires et divergentes (Ndumbe, 1991; Ndumbe *et al.*, 1993; Poveda *et al.*, 1986). A l'exception d'une étude ressortant la diversité génétique du VHD chez quelques personnes originaires du Cameroun vivant en France (Le Gal *et al.*, 2006), aucune étude intégrant une population de taille considérable n'est disponible chez les personnes Camerounaises vivant sur place.

2- QUESTIONS DE RECHERCHE

Au vue de toutes ces considérations, les questions de recherche (QR) suivantes ont été dégagées :

QR1 : Quelle serait la prévalence des infections par les VHB et VHD au sein des populations pygmées, des porteurs chroniques de VHB, et primates non humain du Cameroun ?

QR2 : Quelle serait la diversité génétique de ces virus qui circuleraient dans les populations d'études investigués?

QR3 : Existerait – il une possibilité de transmission de ces virus entre ces différentes populations ?

3- HYPOTHESES DE RECHERCHE

Ces questions de recherche nous ont permis d'émettre les hypothèses de recherche (HR) suivantes :

HR1 : Les VHB et VHD circuleraient au sein des populations camerounaises à des taux élevés au vue de sa situation géographique en zone d'endémicité pour la circulation de ces virus

HR2 : Ces virus présenteraient une variabilité génétique importante au vue des études précédentes réalisées au Cameroun et dans la sous-région Afrique Centrale.

HR3 : Il existerait une possibilité de passage des VHB et VHD du singe à l'homme et vice versa.

4- OBJECTIFS DE L'ETUDE

Pour tester ces hypothèses, les objectifs ont ci-dessous été fixés:

L'objectif général de cette étude était de déterminer la prévalence, la diversité génétique des VHB et VHD et la transmission inter-espèce du VHB et VHD chez les populations pygmées, des porteurs chroniques de VHB et simiennes du Cameroun.

Plus spécifiquement, il s'agissait de :

1. Déterminer la séroprévalence du VHB au sein des populations pygmées et simiennes, et VHD au sein des populations pygmées, des porteurs chroniques de VHB, et simiennes du Cameroun
2. Déterminer la diversité génétique des VHB et VHD au sein de populations des porteurs chroniques de VHB, pygmées et simiennes.
3. Déterminer la transmission inter-espèce des VHB au sein de ces populations

CHAPITRE I:

REVUE DE LA LITTÉRATURE

I. LE VIRUS DE L'HEPATITE B (VHB)

I.1. Historique de la découverte du VHB

Le VHB a été découvert en 1963, quand Baruch S. Blumberg a mis en évidence une réaction inhabituelle et spécifique entre le sérum d'un aborigène australien atteint d'hépatite et ceux des patients hémophiles américains polytransfusés (Alter & Blumberg, 1966; Blumberg *et al.*, 1968). Il pensa avoir découvert une nouvelle lipoprotéine dans la population autochtone qu'il désigna sous le nom d'antigène « Australia » connu plus tard sous le nom d'antigène de surface du VHB (Alter & Blumberg, 1966; Blumberg *et al.*, 1968). Cet antigène sera associé de façon spécifique à une hépatite post-transfusionnelle dite B entre 1967 et 1968 (Prince, 1968).

En 1970, Dane et ses collaborateurs découvrent des particules, grâce à la microscopie électronique dans le sérum de trois patients atteints d'hépatite, agglutinables par des anticorps spécifiques de l'antigène australia (Dane *et al.*, 1970). Le nom d'antigène HBs fut alors imposé pour désigner cet antigène et connu sous le sigle AgHBs.

I.2. Taxonomie du VHB

Le VHB appartient à la famille des *Hepadnaviridae* ou famille des virus à ADN hépatotropes. Cette famille comporte deux genres, le genre *Orthohepadnavirus* et le genre *Avihepadnavirus* (virus qui infectent les oiseaux), qui partagent les caractéristiques communes comme la morphologie, l'organisation génétique, le mode de réplication et la spécificité de l'hôte.

Le genre *Orthohepadnavirus* regroupe des virus qui infectent les mammifères et les rongeurs. Ainsi, on aura le HBV pour les humains, les virus des grands primates non humains (gorille, chimpanzés, gibbons, orangs-outangs), le WMHBV (wooly monkey hepatitis B virus) infectant le singe laineux. Le WHV (woodchuck hepatitis virus) infectant la marmotte américaine *marmota momax* (Summers *et al.*, 1978), le GSHV (ground squirrel hepatitis B virus) infectant l'écureuil fouisseur *spermophilus beecheyii* (Marion *et al.*, 1980), le TSHV (tree squirrel hepatitis Virus) infectant l'écureuil arboricole *sciurus carolinensis pensylvanicus*.

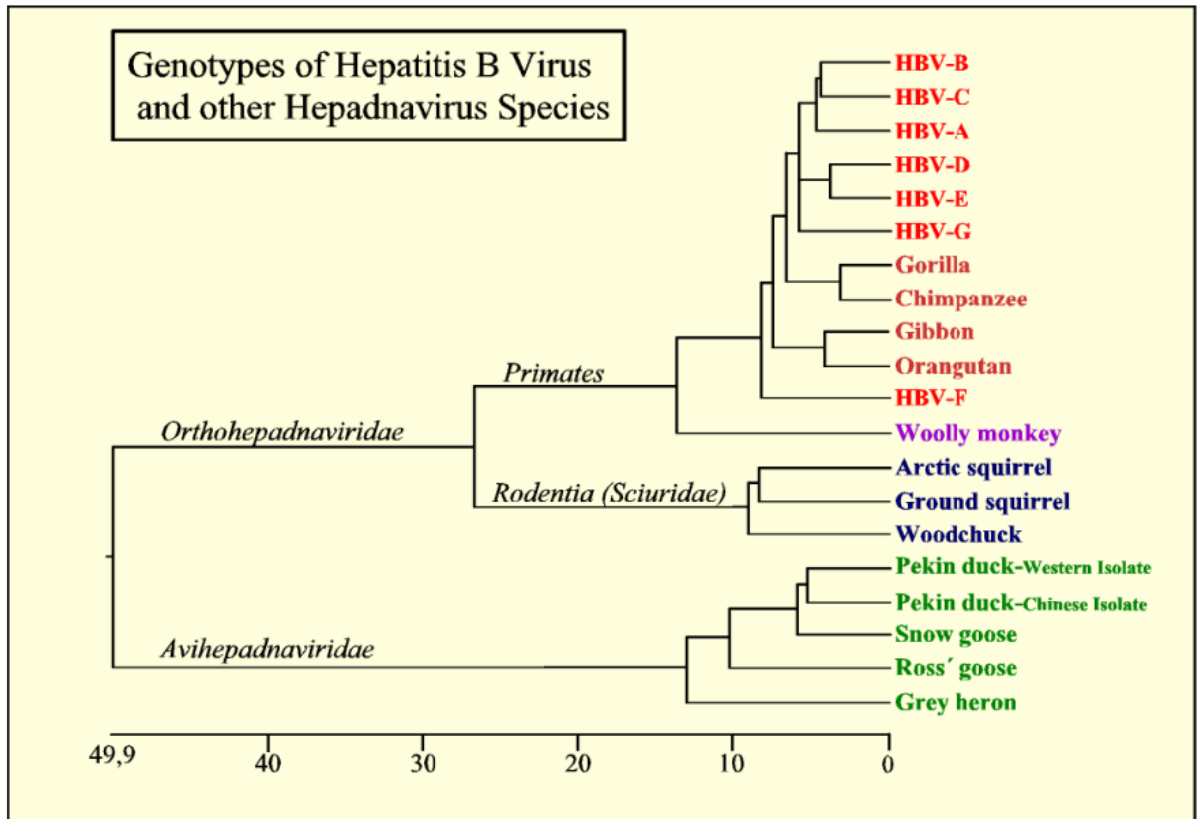


Figure 1: Phylogénie des Hepadnaviridae, (Edmunds *et al.*, 1996)

Les génotypes humains (A-F) partagent la même branche phylogénétique avec les singes. Les virus infectant les petits mammifères sont en bleus et ceux infectant les oiseaux en vert.

I.3. Structure, Génome et protéines du VHB

I.3.1. Morphologie virale

Trois sortes de particules sont observables (Dane *et al.*, 1970; Tiollais *et al.*, 1985).

- Des particules infectieuses de 40 à 48 nm de diamètre, appelées particules de Dane et correspondant aux virions complets (**Figure 2 A**).
- Des particules non infectieuses de forme sphérique ou sphérule, de 18 à 25 nm de diamètre et des filaments ou tubules de 22 nm de diamètre sur 50 à 250 nm de longueur. Ces formes non infectieuses correspondent à une synthèse en excès des protéines d'enveloppe et portent l'antigène HBs (**Figure 2 B et C**).

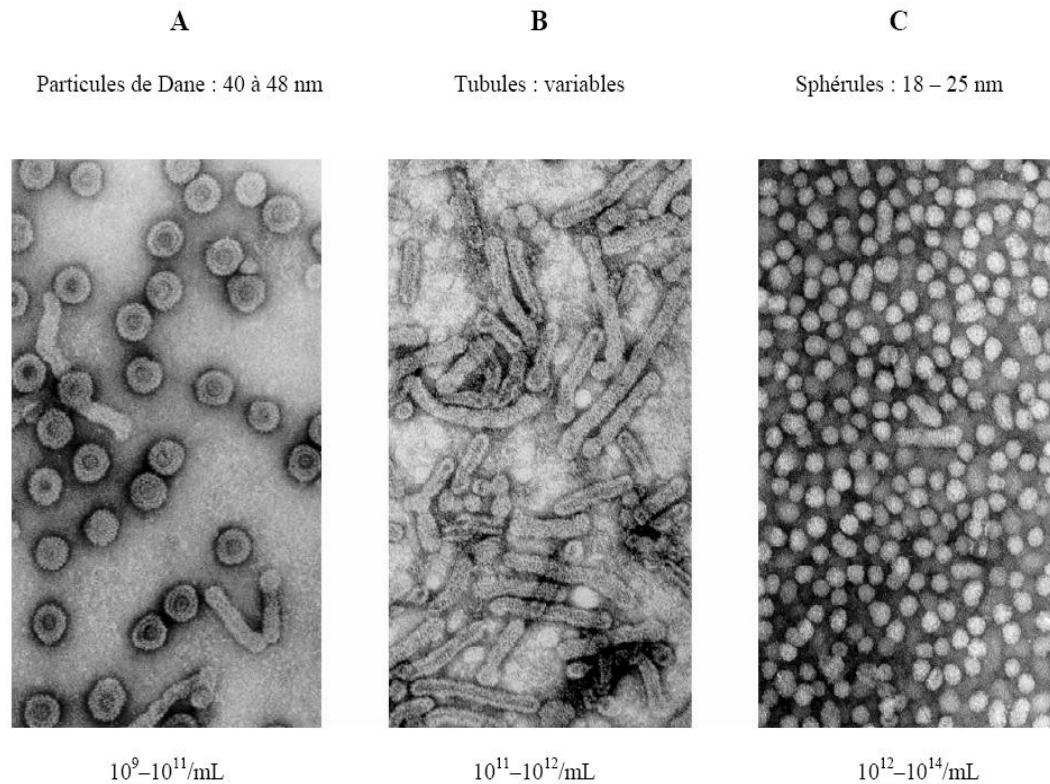


Figure 2 : Photographie en microscopie électronique des particules virales.

(A) : Virion complet infectieux ou particule de Dane, (B) : filaments ou tubules et (C) : Sphères ou sphérules. (Edmunds *et al.*, 1996).

I.3.2 La structure du virion

Le virion est enveloppé et possède une capsidie icosaédrique formée d'un seul type de protéine (protéine C, correspondant à l'antigène HBc), renferme une molécule circulaire d'ADN. La nucléocapsidie est entourée d'une enveloppe externe de nature lipidique qui dérive du réticulum endoplasmique et qui porte trois glycoprotéines de tailles différentes (L ou Large, M ou medium et S ou small) (**figure 3**).

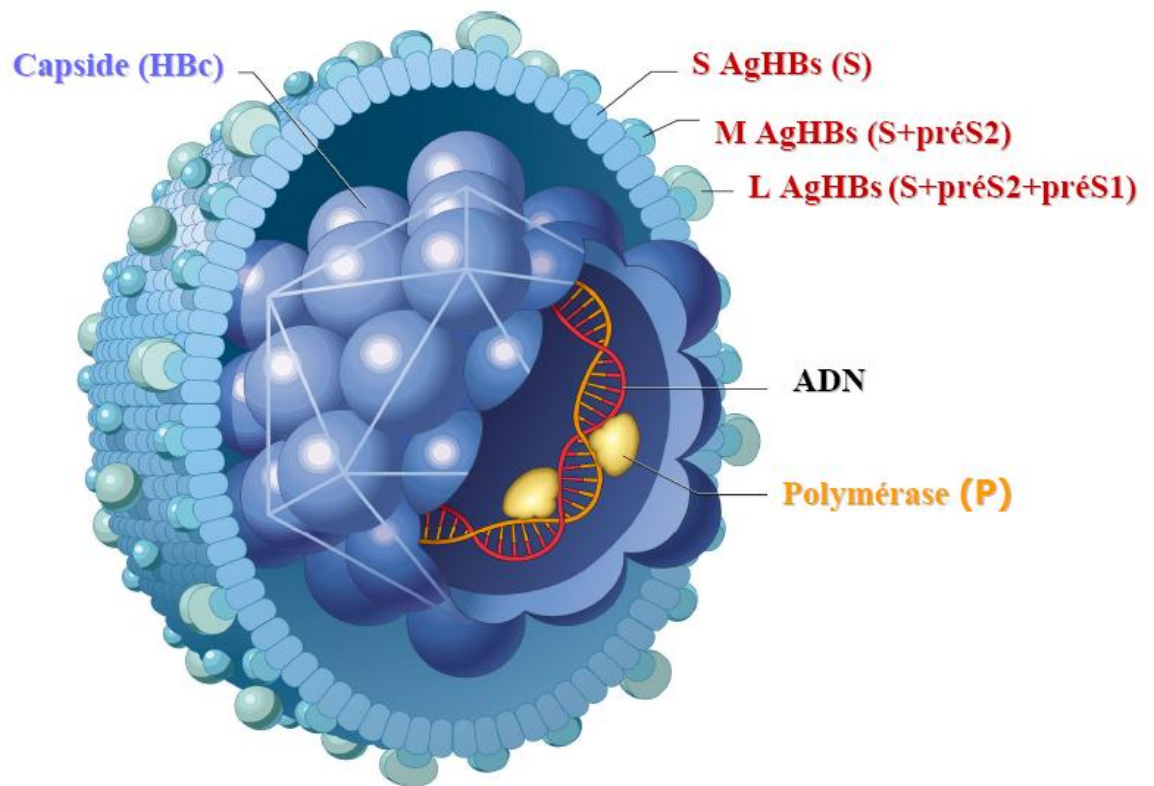


Figure 3 : Structure du virus de l'hépatite B (Stephan Urban, 2010)

Enveloppe constituée des sous unités protéiques codées par les gènes (S, PréS1, PréS2), la capsidre formée par l'union de plusieurs sous unités HBc, l'ADN et les enzymes impliquées dans la réplication.

I.3.3. Propriétés physico-chimiques du VHB

Malgré son enveloppe, le VHB, résiste assez bien à l'éther, à la dessiccation et à la chaleur contrairement aux autres virus enveloppés comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les liquides biologiques contenant le VHB restent infectieux de longues années à -20°C , plusieurs mois à $+30^{\circ}\text{C}$ et plusieurs heures à $+60^{\circ}\text{C}$. Il est détruit par ébullition et par l'action de l'hypochlorite de sodium.

I.3.4. Organisation génomique du VHB

Le virus humain reste le prototype des virus de la famille des *Hepadnaviridae*. Séquencé dès 1979 (Galibert *et al.*, 1979; Pasek *et al.*, 1979), le génome des VHB est un ADN de petite taille (3200 pb). C'est le plus petit génome parmi les génomes des virus à ADN. La numérotation

des bases du génome est faite à partir de l'unique site de restriction de l'enzyme Eco RI pris comme origine dans le sens des aiguilles d'une montre (**Figure 4**). La forme du génome du VHB change selon qu'il se trouve dans le virion ou dans le noyau de l'hépatocyte.

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

Dans le noyau de l'hépatocyte, l'ADN viral est sous forme d'une molécule circulaire, fermée de façon covalente et super-enroulé (cccDNA : covalently closed circular DNA ou ADNccc). Il sert de matrice pour la synthèse des ARN messagers viraux. Extrêmement stable et persistant sous forme épisomique au sein des hépatocytes et d'autres cellules permissives, l'ADNccc reste à l'origine du portage chronique et des phénomènes de réactivation.

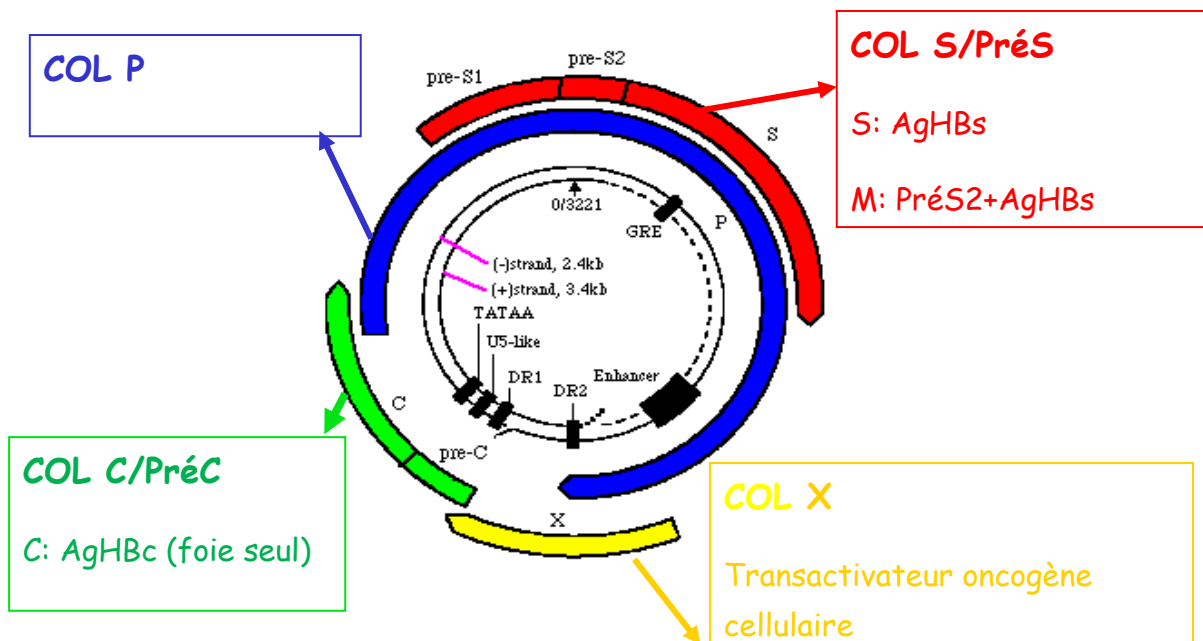


Figure 4 : Structure et organisation génomique du VHB des mammifères

L'ADN circulaire (en noir), partiellement double brin, avec le nucléotide 1 correspondant au seul site de restriction d'EcoRI. Quatre promoteurs et des séquences de régulation (signal de polyadénylation, enhancer) qui commandent la synthèse de quatre transcrits codant la capside 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 (COL) (Seeger & Mason, 2000).

L'organisation génomique du VHB est très complexe : quatre cadres ouverts de lecture (COL) codant les principales protéines structurales et non structurales du virus, quatre promoteurs et deux éléments « enhancer » pour la régulation de la transcription des ARNs viraux, le signal de polyadénylation et certains signaux nécessaires pour la réplication de l'ADN viral. Ces COLs sont situés en amont des quatre principaux gènes viraux (P, S, X et C). (Figure 4)

I.3.4.1. Les Cadres Ouverts de Lecture (COL)

Quatre COLs chevauchants dans la même orientation transcriptionnelle ont été identifiés et codent pour neuf protéines structurales et non structurales du virus.

-Le COL du gène préS/S est situé en amont du gène S (pré-S1 + pré-S2 + S) qui comporte trois codons initiateurs de la transcription (AUG). Trois types de protéines peuvent être ainsi synthétisées: la protéine S ou SHBs (gène S), la protéine M ou MHBs (gènes Pré-S2 + S), et la protéine L ou LHBs (pré-S1 + pré-S2 + S). Les trois protéines possèdent un domaine commun correspondant à l'antigène HBs (Galibert *et al.*, 1979).

-Le COL P couvre le gène P qui s'étend sur les $\frac{3}{4}$ du génome et code pour trois peptides : la protéine terminale, la polymérase virale proprement dite et la RNase H. Le clivage des peptides viraux est assuré par les enzymes cellulaires.

-Le COL C couvre le gène C qui comporte deux codons initiateurs qui génèrent deux protéines virales. Le domaine C code pour la protéine de la nucléocapside (AgHBc) (Pasek *et al.*, 1979). La lecture en phase des domaines pré-C + C conduit à la sécrétion d'une protéine soluble non structurale excrétée dans le sérum appelée protéine « e » ou antigène HBe.

-Le COL X couvrant le gène X code pour une protéine régulatrice HBx. Le genre *Avihepadnavirus* est dépourvu du gène X, bien qu'une comparaison des séquences d'ADN montre qu'il le possédait et qu'il l'aurait perdu au cours de l'évolution.

I.3.4.2. Les séquences régulatrices

Pour la régulation de sa production, le VHB possède deux éléments activateurs de la transcription : «enhancers » (Enh) dont Enh I situé en amont du gène X et Enh 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 transcrits viraux.

Deux autres éléments influencent la transcription virale : i) le premier est le Glucocorticoïde Responsive Élément ou GRE qui, situé dans le gène S accroît l'expression des gènes d'un facteur de 5. En effet, on observe souvent une exacerbation de la virémie chez les patients sous traitement avec les glucocorticoïdes ; ii) Le second est l'élément de régulation post-transcriptionnelle (ERP), qui chevauche complètement avec le promoteur X et partiellement avec l'EnhI et le début du gène X. L'ERP permet l'exportation efficace des ARN non épissés du VHB vers le cytoplasme.

I.3.4.3. Les éléments structuraux

Les éléments structuraux regroupent le signal d'encapsidation, deux séquences répétées directes (DR1 et DR2) et un signal de polyadénylation. En dehors du DR2, tous ces éléments sont situés sur une courte région du génome de moins de 100 nucléotides (**Figure 4**).

Le signal d'encapsidation (**figure 5**) permet l'encapsidation simultanée de l'ARN pré-génomique et de la polymérase. Il est étroitement lié à l'initiation de la synthèse de l'ADN(-). C'est une région hautement conservée du génome des *Hepadnaviridae* et est constituée de deux tiges en boucles superposées.

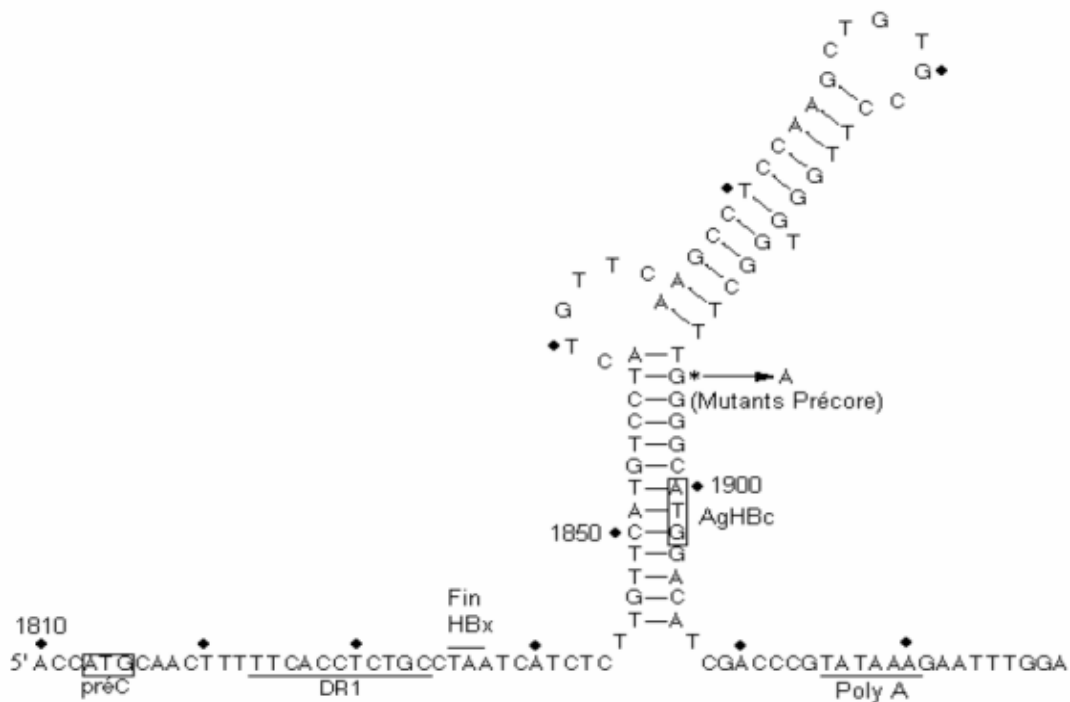


Figure 5 : Structure de signal d'encapsidation (Karin Kidd-Ljunggren, 2002)

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

I.3.5. Structure et fonction des protéines virales.

Les protéines structurales et non structurales possèdent de nombreuses fonctions et propriétés. Certaines sont indispensables à la production des particules virales et d'autres semblent jouer un rôle important dans la pathogénie du VHB.

I.3.5.1. La polymérase virale

C'est un polypeptide ayant entre 832 et 845 aa selon le génotype. Son poids moléculaire est de 92 kDa. Elle comporte trois domaines fonctionnels dont de 5' en 3' à :

-Le domaine amino-terminal : constitué de la protéine terminale qui se lie à l'extrémité 5' du brin d'ADN négatif et sert également d'amorce à l'initiation de sa synthèse (primase).

-Le domaine carboxy-terminal : doté d'une double activité de transcriptase inverse et de RNase H. La transcriptase inverse assure la synthèse de l'ADN génomique et du deuxième brin d'ADN complémentaire à partir de l'ARN pré-génomique tandis que la RNase H dégrade l'ARN complémentaire du brin d'ADN(+) néoformé.

-Les domaines pré-C + C dont la lecture conduit à la sécrétion d'une protéine non structurale contenant l'épitope conformationnel de l'AgHBe. L'AgHBe est indispensable pour les infections in vitro (Chang *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2008). Des expériences menées sur les souris suggèrent que l'AgHBe cause une déplétion des cellules TH1 helpers réduisant ainsi l'habilité des lymphocytes T cytotoxiques à éliminer des hépatocytes infectés (Milich *et al.*, 1998; Milich *et al.*, 1990; Milich *et al.*, 1997); ceci favorise l'envahissement viral.

I.3.5.2. Les protéines d'enveloppe ou de surface

La portion du gène S code pour les trois protéines L, M et S ayant le même cadre ouvert de lecture et la même extrémité carboxylique.

- La protéine S (226 acides aminés ; non glycosylée : p24 ; forme glycosylée : gp 28) est la plus petite des trois protéines. C'est le composant majeur de l'enveloppe virale et également des suspensions vaccinales utilisées contre le VHB. En effet, la plus part des anticorps neutralisants ciblent une partie de l'AgHBs qui est exposée à la surface des particules virales. C'est une protéine membranaire et le modèle admis est qu'elle possède quatre régions hydrophobes et transmembranaire TM avec une large région centrale et hydrophile (Région Hydrophile Majeure (RHM)) exposée à la surface de la particule virale (figure 6). La protéine S porte les principaux épitopes (a, d/y, r/w) qui définissent le sérotype viral.

- La protéine M (281 aa ; non glycosylée : p24 – p31 ; glycosylée : gp 33 – gp 36) possède la même topologie membranaire que la protéine S. La protéine M ne semble pas être essentielle pour la morphogénèse des particules virales infectieuses.

- La protéine L (329 aa ; non glycosylée : p39 ; glycosylée : gp42) est traduite à partir d'un ARNm de tout le cadre ouvert de lecture. La protéine L peut avoir deux topologies membranaires. Les régions PréS1, PréS2 et la Région TM1 de l'AgHBs sont initialement 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 passage dans le réticulum endoplasmique (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) jouent un rôle déterminant dans la reconnaissance de l'hépatocyte par le virion (Lu & Block, 2004). La protéine L fournit les ligands à l'HBcAg au cours du processus de l'assemblage. En dehors de la glycosylation, L subit une myristylation de son côté N terminale. Cette myristylation est nécessaire pour l'infectivité virale.

Les protéines S, M et L ont toute la même spécificité antigénique HBs portée par une séquence hydrophile correspondant aux acides aminés 121 à 150 de la protéine S. Les anticorps dirigés contre la protéine S sont suffisants pour procurer la protection contre l'infection par le VHB. Ces trois protéines sont essentielles dans l'enveloppement de la nucléocapside virale.

Les anticorps dirigés contre les épitopes du domaine pré-S1 en dehors du domaine S peuvent aussi neutraliser les virus permettant ainsi de contourner les problèmes issus de la recombinaison virale (Lambert *et al.*, 1990).

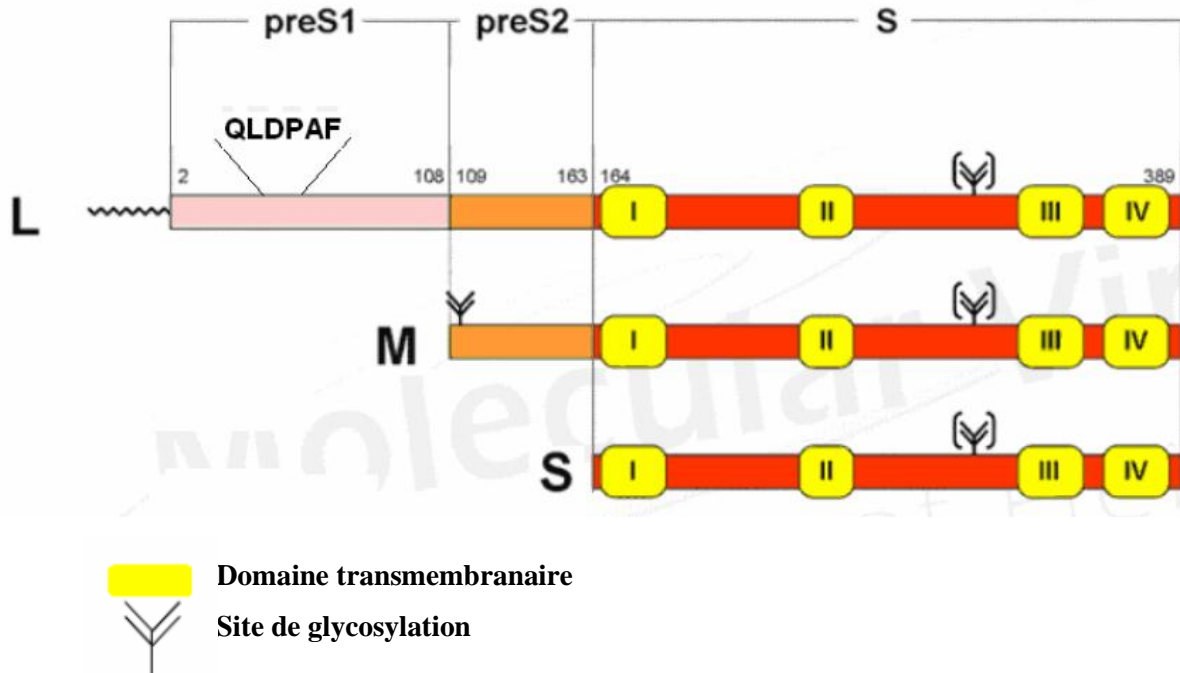


Figure 6: Schéma de la région codant les trois protéines d'enveloppe

La protéine L correspond à la lecture des gènes preS1, S2 et S. La protéine M correspond à la lecture des gènes preS2 et S. La protéine S correspond à la lecture du gène S. QLDPAF est la séquence peptidique de l'extrémité N-terminale de la traduction du gène PréS1 (Lambert *et al.*, 1990).

I.3.5.3. Les protéines de la capside et la protéine précore

Le gène du précore/core est traduit à travers un même COL et deux codons initiateurs. Ces deux codons initiateurs en phase servent à la traduction de la protéine de la capside (protéine core ou AgHBc) et d'une protéine soluble (protéine précore ou protéine e ou AgHBe).

La protéine core est le constituant majeur de la capside. L'AgHBc est une protéine phosphorylée de 22 kDa (183 à 185 aa) produite par traduction initiée au second codon AUG du gène PréC/C. Elle comporte deux domaines à savoir : le domaine N terminal important pour l'auto assemblage et le domaine C-terminal riche en arginine (protamine). La protamine compte en moyen 166 résidus d'aa et contient trois sérines qui possèdent des sites de phosphorylations libres jouant un rôle important dans la synthèse des acides nucléiques viraux (Lan *et al.*, 1999; Liao & Ou, 1995). La formation de la capside en sa forme icosaédrique résulte de la formation des dimers entre les sous unités du HBcAg stabilisée à travers deux ponts dissulfures (Chang *et*

al., 1994). La structure de la capside est formée de 120 dimers ayant un diamètre de 36 nm avec un nombre de triangulation égale à 4 (Crowther *et al.*, 1994). Une expression du gène Core avec un tronçage de l'extrémité C conduit à une structure de la capside à 90 dimères avec un nombre de triangulation égale à 3 (Conway *et al.*, 1998). La structure du Core a été décrite grâce la microscopie cryoelectronique à une résolution de 7,4 Angstrons (Bottcher *et al.*, 1997a; Bottcher *et al.*, 1997b; Crowther *et al.*, 1994) suivi de la cristallographie aux rayons X (Wynne *et al.*, 1999a; Wynne *et al.*, 1999b).

La protéine précore (212 aa ; 25 kDa) est le précurseur de l'AgHBc. Elle est synthétisée à partir du premier codon ATG du COL C. Elle diffère de la protéine de la capside 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. 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 et sa présence témoigne de la réplication virale (Garcia *et al.*, 1988; Ou *et al.*, 1989). A ce jour le rôle de l'AgHBe reste non élucidé. Elle protégerait les hépatocytes infectés contre la destruction par les lymphocytes T cytotoxiques et faciliterait l'établissement de l'infection virale primaire (Milich *et al.*, 1998; Milich *et al.*, 1990). Par contre, cet antigène est très immunogène et on observe une séroconversion anti HBe.

I.3.5.4. La protéine X

La protéine X ou HBx est un polypeptide de 154 aa et 17 kDa de masse moléculaire. elle serait principalement présente dans le cytoplasme des cellules infectées et seule une petite fraction serait retrouvée dans le noyau cellulaire (Sirma *et al.*, 1998).

Si son rôle *in vivo* n'est pas clairement défini, des études *in vitro* ont montré que la protéine X était un activateur de la transcription de nombreux gènes cellulaires. Cette protéine ne semble pas interagir directement avec l'ADN, mais plutôt agir via l'activation d'autres facteurs de transcription (Block *et al.*, 2003). Son rôle dans les processus de cancérisation a été évoqué mais reste à ce jour non prouvé (Block *et al.*, 2003). Elle possède une activité protéine kinase (Sérine

et Thréonine kinase) et assure sa propre phosphorylation. Son domaine N-terminal exerce une action de régulation négative anti apoptotique et le domaine C-terminal une activité transactivatrice et pro apoptotique

I.4. Le cycle de multiplication du VHB

I.4.1. Tropisme cellulaire

Le VHB a un tropisme essentiellement hépatocytaire et les formes répliquatives sont essentiellement retrouvées dans les hépatocytes. Cependant, le virus peut aussi se multiplier dans les cellules de la lignée sanguine. Les lymphocytes B ont un récepteur pour le VHB. L'existence d'une multiplication dans d'autres organes n'est pas certaine. Au cours d'infection aiguë, l'ADN et l'ARN du virus 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 T CD8 +, dans le pancréas, les reins et la peau (Tiollais *et al.*, 1985). On peut aussi noter des symptômes extra hépatiques au cours d'infection par le VHB comme les pancréatites, les glomérulonéphrites, neuropathies, anomalies du sperme. Par contre, au cours des infections chroniques, le virus est presque exclusivement présent dans le foie. Les cellules lymphocytaires peuvent servir de réservoir pour le virus, ce qui peut poser des problèmes lors de la transplantation (infection du greffon) ou de traitement antiviral (reprise de la réplication en fin de traitement).

I.4.2. La réplication virale

Le cycle répliquatif du VHB se déroule schématiquement en des étapes successives suivantes : (i) la fixation au récepteur, l'internalisation et les étapes précoces de la réplication ; (ii) la synthèse des protéines virales ; (iii) la réplication du génome viral ; (iv) enfin l'assemblage et la sortie des virions (**Figure 7**).

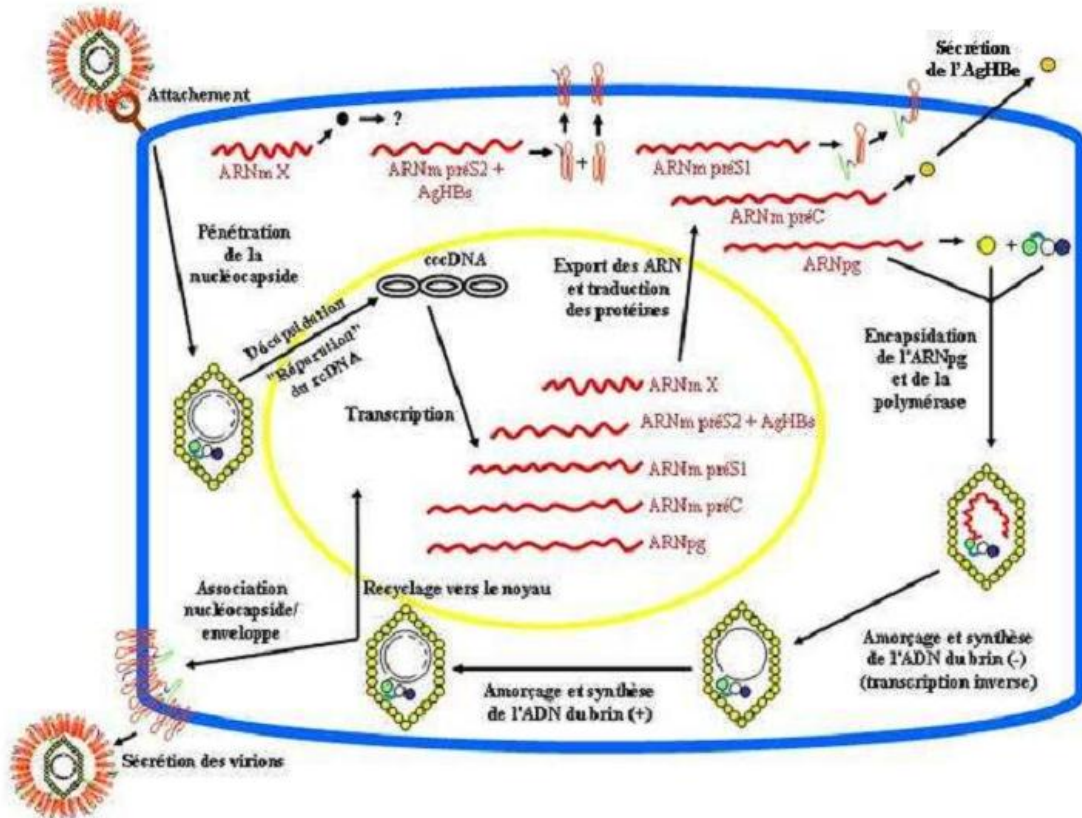


Figure 7 : Cycle de répliquatif du VHB, (Kay, 2004)

L'attachement sur l'hépatocyte se fait par le domaine pré-S1 de la protéine L d'enveloppe. L'ADN viral est complété par la polymérase virale associée au virion en ADN bicaténaire, circulaire covalemment clos (cccADN) 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.

I.4.2.1. Les étapes précoces du cycle de multiplication

Le virion reconnaît et s'attache à l'hépatocyte à travers le récepteur cellulaire encore non identifié à ce jour. La fusion entre l'enveloppe virale et la paroi cellulaire permet la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire. La nucléocapside migre vers le noyau grâce à des signaux de localisation nucléaire portés par l'antigène HBc. Une fois dans le noyau et à travers un mécanisme encore mal connu, l'ADN asymétrique ouvert devient double brin circulaire fermé de façon covalente ; on parle alors de cccADN (Covalently Closed Circular DNA). Le cccADN s'associe à des histones cellulaires pour former un ADN superenroulé « mini chromosome ». Un ARN pré-génomique est transcrit par une ARN polymérase II cellulaire à partir du brin L négatif

de cet ADN superenroulé. L'ARNpg et les différents ARNs messagers codant pour les principales protéines virales vont migrer dans le cytoplasme cellulaire pour traduction.

I.4.2.2. La synthèse des protéines virales

Dans le cytoplasme, l'ARNpg sert de matrice pour la synthèse de l'antigène HBc et de la polymérase ; de façon parallèle, les différents ARNm viraux sont traduits en protéines virales. Les protéines d'enveloppe et la protéine PréC sont dirigées vers le réticulum endoplasmique tandis que l'antigène HBe et les protéines virales passent dans l'appareil de golgi pour maturation.

I.4.2.3. La réplication du génome viral

L'ARN prégénomique et la polymérase sont recrutés dans les capsides néoformées par l'antigène HBc. Le brin d'ADN L de polarité négative est synthétisé dans la capside par un processus de transcription inverse suite à l'action de l'ADN polymérase virale. La synthèse du court brin S de polarité positive débute ensuite à partir du brin L (-) d'ADN qui vient d'être formé.

I.4.2.4. Assemblage et la sortie des particules

L'AgHBe et les particules virales vides sont sécrétés. Les nucléocapsides sont enveloppées et les particules de Dane sont sécrétées à leur tour.

I.5. La variabilité génétique du virus de l'hépatite B

Le VHB est doué d'une variabilité génétique extrêmement importante en dépit de la complexité et de l'organisation très compacte de son génome viral. La diversité des VHB peut être divisée en deux catégories : la variabilité génomique et la variabilité phénotypique.

I.5.1. La variabilité génomique du virus de l'hépatite B

La variabilité génomique est le résultat de l'évolution naturelle et graduelle du virus au cours du temps et correspond à l'apparition de mutations (des délétions et des insertions de nucléotides dans le génome viral) au cours des cycles de réplication.

Au cours de son cycle de réplication, le VHB utilise la reverse transcriptase (polymérase virale) qui manque d'activité 3'5'-exonucléasique et ne corrige donc pas ses erreurs de transcription ; la capacité des hépatocytes à accumuler l'ADN superenroulé et la capacité répliquative (Fitness) des souches virales.

Le taux de mutations spontanées dues à la polymérase virale est estimé à environ 5.10^{-5} substitutions par site et par an (Michitaka *et al.*, 2006; Osiowy *et al.*, 2006). La survenue d'erreurs de réplication est favorisée par l'important niveau de production du VHB (environ 10^{11} virions par jour) : jusqu'à 10^{10} mutations peuvent être générées quotidiennement sur l'ensemble du génome.

Cependant, l'émergence de nouvelles souches de VHB est limitée par le nombre d'hépatocytes pouvant être infectés (dépendant du turn-over hépatocyttaire) et par nombre de molécules de cccDNA qu'ils peuvent contenir. Ainsi, un variant émergeant ne peut prédominer sur une souche préexistante que par un mécanisme de compétition pour l'infection des hépatocytes.

En dehors de ces mutations, le phénomène de recombinaison semble jouer un rôle important dans la grande plasticité du VHB. La recombinaison consiste en l'échange de séquences nucléotidiques de deux ou plusieurs fragments génomiques parentaux pour former des nouveaux génomes viraux dits recombinants.

I.5.1.1. Les sérotypes du virus de l'hépatite B

L'évidence de la variabilité du VHB à travers le monde a été très vite démontrée à travers les sérums des patients qui avaient eu une séroconversion anti HBs. Ces sérums ne réagissaient pas de la même manière avec les antigènes HBs des différents porteurs chroniques. La première classification des différents sérotypes fût alors établie en utilisant un panel standard d'antisérums

(Bouvier & Williams, 1975; Courouce *et al.*, 1983). La région immunogène majeure qui couvre environ 23 résidus d'acides aminés (124-147) et possédant le déterminant antigénique « a » est commun à tous les isolats et ne permet pas de faire une classification. La découverte des deux sous types de déterminants antigéniques *d/y* et *r/w*, ayant une base moléculaire va constituer le fondement de la classification des sérotypes viraux (**Tableau I**). Ces deux déterminants antigéniques dépendent de la nature des acides aminés à des positions 122 et 160 de HBsAg majeure. Si l'acide aminé à la position 122 est l'arginine (Arg ou 122R), le sous type est *y* et si c'est la Lysine (Lys ou 122K), le sous type est *d* (Okamoto *et al.*, 1987a; Okamoto *et al.*, 1987b). De façon similaire, 160R définit le sous type *r* et 160K le sous type *w* (Okamoto *et al.*, 1987a; Okamoto *et al.*, 1987b). Les quatre combinaisons possibles et en addition avec les acides aminés immunogènes ont donné 10 sous types distincts (Norder *et al.*, 1992). Le sérotypage des souches circulantes de VHB a été utilisé dans des études épidémiologiques pour tracer la chaîne des infections nosocomiales, des infections iatrogéniques et les transmissions intra familiales.

Tableau I : Classification des sérotypes du virus de l'hépatite B. : (Norder *et al.*, 1992; Okamoto *et al.*, 1987b).

sérotipe	Les positions des acides aminés caractéristiques sur la séquence AgHBs
<i>ayw 1</i>	122R + 160K + 127P + (134F et/ou 159A)
<i>ayw 2</i>	122R + 160K + 127P
<i>ayw 3</i>	122R + 160K + 127T
<i>ayw 4</i>	122R + 160K + 127L
<i>ayr</i>	122R + 160R
<i>adw2</i>	122R + 160K + 127P
<i>adw3</i>	122K + 160K + 127 T
<i>adw4q⁻</i>	122K + 160K + 127L + 178Q
<i>adrq⁺</i>	122K + 160R + 177V + 178P
<i>adrq⁻</i>	122K + 160R + 177A

R(arginine), K(lysine), P(Proline), F(phénylalanine), A(alanine), T(thréonine), V(valine), L(leucine), Q(glutamine)

I.5.1.2. Les génotypes et sous génotypes du virus de l'hépatite B

La première séquence complète du génome de VHB a été publiée en 1979 (Galibert *et al.*, 1979). Dès lors, les séquences se sont accumulées dans Genbank. Sur la base de 18 séquences complètes de VHB disponibles au cours des années 1980, quatre génotypes classés de A à D ont été originalement définis sur les critères d'une divergence de plus de 8% sur la totalité du génome (Okamoto *et al.*, 1988). Ainsi, la détermination génotypique par phylogénie moléculaire a été proposée (Mizokami *et al.*, 1999; Ohba *et al.*, 1995). De façon consécutive, le séquençage de la région codant la protéine de l'antigène de surface S et l'analyse phylogénétique réalisée sur cette portion du gène ont permis de décrire deux nouveaux génotypes E et F. Ceci ajoutera un autre critère de définition du nouveau génotype à savoir 4% de divergence dans la région S (Norder *et al.*, 1992). Le génotype F fût confirmé par l'analyse des séquences du génome complet un an plus tard (Naumann *et al.*, 1993). Le nombre de génotypes connus de VHB est de 8 avec la description des génotypes G (Stuyver *et al.*, 2000) et H (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002). Très récemment, les nouveaux génotypes I (Huy *et al.*, 2008; Olinger *et al.*, 2008) ; et J (Tatematsu *et al.*, 2009) ont été proposés.

La variabilité intra génotypique a introduit le concept de sous génotypes sur la base d'une divergence comprise entre 4% et 7,5% sur le génome complet permettant de définir un sous génotype dans le génotype. Ainsi, des sous génotypes ont été décrits à l'intérieur des génotypes A (Kimbi *et al.*, 2004), (Sugauchi *et al.*, 2004a; Sugauchi *et al.*, 2004b). Tous les génotypes à l'exception des génotypes E, G et H possèdent des sous génotypes.

Par ailleurs, les souches présentant une divergence inférieure à 4% seront classées comme des « clades » (Kramvis *et al.*, 2008). Les sous génotypes A4 (Olinger *et al.*, 2006) et A3 de divergence moyenne 3,8% et 3,4% respectivement sont des clades et non des sous génotypes. La distribution géographique similaire (Afrique centrale et Ouest) concourt à supporter que les souches A3 et A4 appartiennent au même sous génotype. La distance génétique faible et l'endémicité similaire des sous génotypes B3, B5 et B7 récemment décrits suggèrent que ces souches peuvent être des clades du même sous génotype de B.

I.5.1.3. Répartition géographique des génotypes du virus de l'hépatite B dans le monde

La distribution géographique des génotypes du VHB n'est pas homogène et reflète les mouvements de population. Dans la majorité des pays, les patients sont infectés par un nombre limité de génotypes, dans certains comme les USA, où la mixité ethnique est importante, tous les génotypes sont représentés. La tendance actuelle étant à l'accroissement des mouvements migratoires, les mélanges des génotypes sont favorisés, de même que les phénomènes de surinfections et de recombinaisons.

Le génotype A est dominant en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord. Les génotypes B et C sont surtout présents en Asie et le génotype E, en Afrique. Le génotype D est retrouvé sur tous les continents, avec une plus forte prévalence dans le Sud de l'Europe et le Moyen-Orient. La localisation du génotype F est limitée à l'Amérique Centrale et Amérique du Sud. Des cas isolés d'infections dues au génotype G ont été décrits en France, en Allemagne et aux USA. Le génotype H, qui pourrait dériver du génotype F, a été identifié en Amérique Centrale (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002). La **Figure 8** présente la répartition des génotypes à travers le monde.

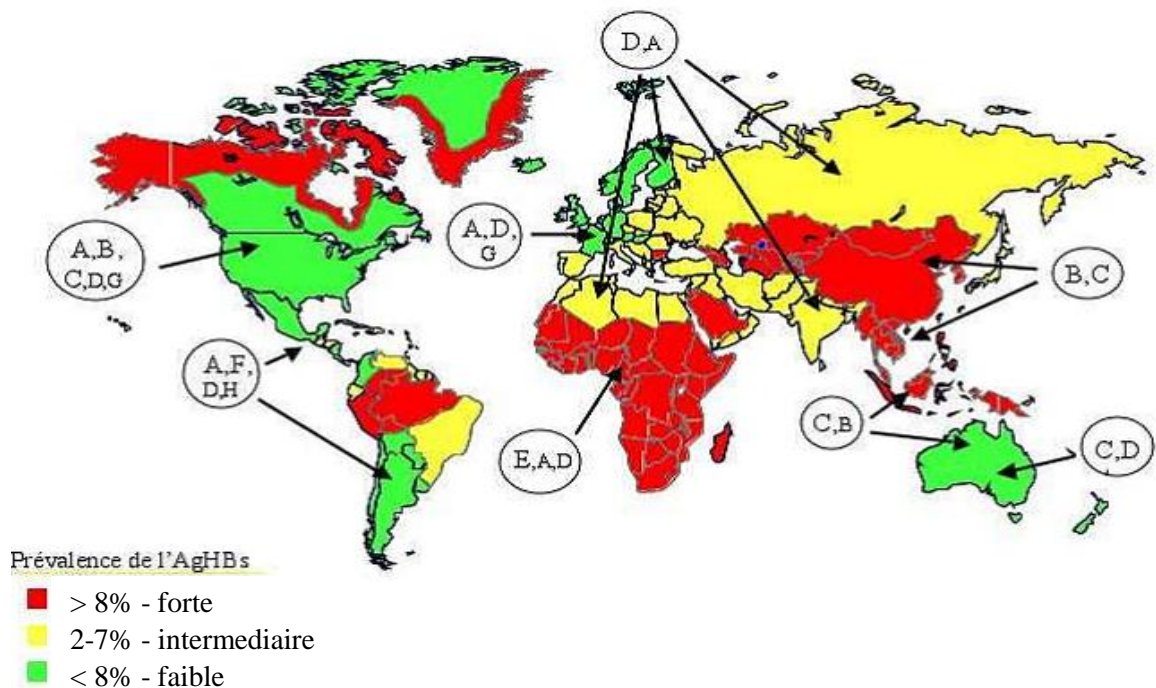


Figure 8 : Epidémiologie et répartition des génotypes du VHB dans le monde. (Lavanchy, 2004)

La couleur verte représente les zones à faible prévalence, la couleur jaune, les zones de prévalence intermédiaire et la couleur rouge représente les zones de forte prévalence. Les différents génotypes décrits dans les différentes régions sont répertoriés dans les cercles.

I.5.1.4. Infection multiple et recombinaison des virus de l'hépatite B

Phénomène encore inexpliqué dans le cas du VHB, la recombinaison reste un facteur très important dans l'évolution génétique de ce virus. Elle survient entre les génotypes dans les régions géographiques où plusieurs souches génotypiques distinctes co-circulent. A ce jour, plus de 24 formes recombinantes phylogénétiquement distinctes ont été identifiées impliquant tous les génotypes humains ainsi que les souches de chimpanzé et de Gibbon (Simmonds & Midgley, 2005). Plus de 60% des recombinaisons ont lieu dans la région couvrant 1640-1900 (Yang *et al.*, 2006). Les recombinaisons surviennent souvent au niveau des gènes voisins (Simmonds & Midgley, 2005; Yang *et al.*, 2006). La recombinaison peut survenir au cours des infections simultanées ou bien au cours des infections séquentielles avec des génotypes distincts. Avec ce phénomène d'interchangeabilité de gènes entre les génotypes et sur toute la totalité du génome, la topologie phylogénétique du VHB va être difficile à réaliser. Il conviendra dès lors de bien choisir la région d'analyse car les interprétations pourront changer d'un gène à l'autre. La comparaison des séquences du génome complet redevient d'actualité pour redéfinir les taux de divergences.

I.5.1.5. Pathogénicité des génotypes

De plus en plus, des études menées sur la corrélation entre le génotype du VHB et la pathogénicité de la maladie hépatique montrent que le génotype du VHB est un facteur important dans la progression et l'évolution clinique de la maladie. Les génotypes C et D sont significativement impliqués dans la survenue de la cirrhose et du CHC comparés aux génotypes A ou B (Kao *et al.*, 2010; Lin & Kao, 2011; McMahon, 2009). De plus, la séroconversion HBe suite au traitement par l'interféron standard ou pégylé est plus observée chez les patients de génotypes A ou B comparés aux patients de génotypes C ou D.

I.5.2. La variabilité phénotypique du VHB

La variabilité phénotypique est le résultat des pressions sélectives de l'environnement viral. Cette pression peut être due naturellement à la réponse immune de l'hôte face à l'infection virale, la vaccination ou les traitements (antiviraux, immunoglobulines).

I.5.2.1. Les mutations Pré-S1 et Pré-S2 et la toxicité cellulaire

Les mutations qui affectent le domaine PréS des protéines d'enveloppe sont les délétions. Certaines mutations peuvent conduire à la rétention intracellulaire de la protéine PréS1 (Bock *et al.*, 1997; Melegari *et al.*, 1994) ; ce qui inhibe la sécrétion des virions et augmente la toxicité cellulaire. Bien que les mutants PréS1 soient à mesure de se répliquer, ils ont besoin d'un virus helper et se retrouvent en population virale minoritaire. D'un autre côté, il apparaît quelques contraintes sur les mutations PréS2 ; la protéine à lui seule est présente en petite quantité dans les préparations (Fernholz *et al.*, 1993). Les mutants PreS émergent dans les infections chroniques et souvent chez des patients traités à l'interféron (Gerner *et al.*, 1998; Santantonio *et al.*, 1992). Les mutants PréS doivent jouer un rôle minimal dans l'évolution des VHB car l'on a très peu d'évidence dans leur transmissibilité.

I.5.2.2. Les mutations du gène S : échappements vaccinaux et diagnostic.

L'antigène S est la cible principale de neutralisation virale soit de façon naturelle, soit de façon inductive à travers la vaccination. Certaines mutations décrites dans le gène S et particulièrement dans le déterminant « a » ont été corrélées à une absence ou à une baisse d'affinité des anticorps dirigés contre la protéine S ; ce qui conduit à une baisse ou une absence totale de protection contre le VHB bien qu'étant porteur d'anticorps anti HBs (Carman *et al.*, 1995; Grethe *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998). Le premier cas d'échappement vaccinal fût décrit chez un enfant né d'une mère qui avait développé une hépatite B aigue malgré une vaccination et une immunisation effective contre le VHB (Zanetti *et al.*, 1988). La caractérisation de la souche virale a montré une substitution de la glycine par l'arginine à la position 145 (G145R) de l'antigène S (Coleman, 2006; Zanetti *et al.*, 1988). Cette mutation fût à l'origine des

mutants d'échappement vaccinal. D'autres substitutions dans le déterminant antigénique « a » (I/T126A/N, A128V, Q129H/R, G130N, M133L/T, K141E, D144A/H) et en dehors de « a » (P120S/T) ont été aussi associées à l'échappement vaccinal (Cooreman *et al.*, 2001; Oon *et al.*, 1999). D'un autre côté, la substitution F183C confère une baisse d'affinité des HBsAgs pour les anticorps monoclonaux dirigés contre le déterminant antigénique « a » (Cooreman *et al.*, 1999; Torresi *et al.*, 2002) et un défaut de réactivité des trousse commerciales de détection de HBsAg (Ireland *et al.*, 2000). Le résidu C183 est le résidu normal pour les génotypes F et H ; ce qui pose dès lors un problème de couverture vaccinale dans les régions géographiques où ces génotypes circulent.

D'un autre côté, il a été démontré que ces mutants du gène S surtout le G145R (le plus connu et le plus étudié) sont bien réplicatifs et transmissibles ; ce qui implique le rôle important qu'auront à jouer ces mutants dans l'évolution moderne du VHB.

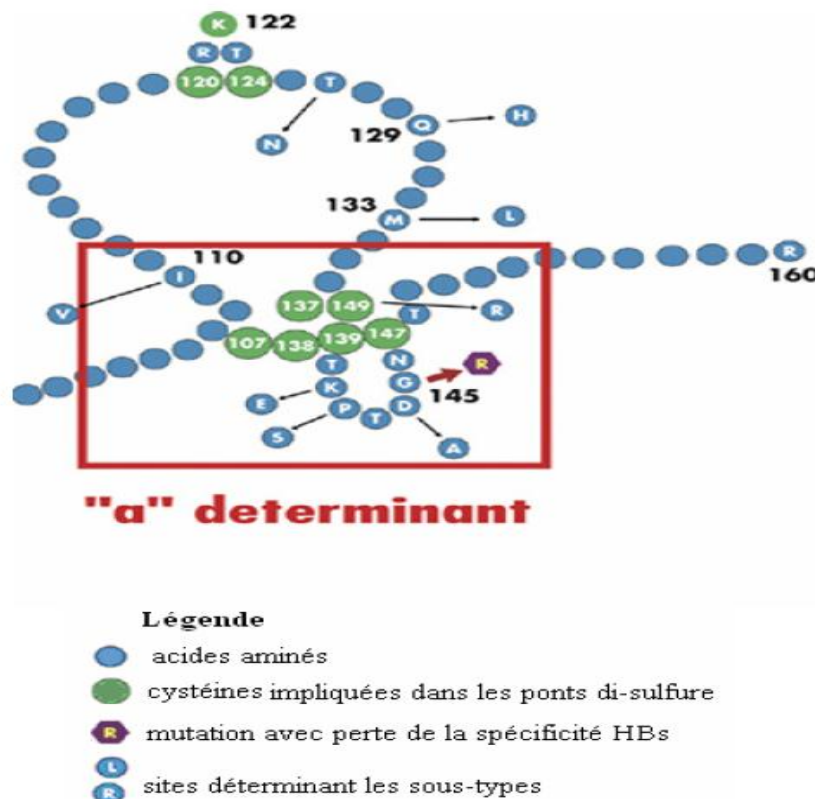


Figure 9 : Principales mutations décrites sur le déterminant antigénique « a » de la protéine S. (Carman *et al.*, 1990).

I.5.2.3. Les mutations dans le promoteur basal du core et sévérité de la maladie hépatique

Le promoteur basal du core ou basal core promoter (PBC ou BCP) s'étend entre les positions 1634 et 1782 (148 nucléotides). Les souches présentant certaines mutations dans le BCP ont été associées à des formes d'hépatite active sévère et au CHC. Les substitutions aux positions A1762T et G1764A ont été identifiées comme étant associées dans le CHC des souches isolées chez les patients. Cette double mutation occasionne la diminution de la production de l'AgHBe (Baptista *et al.*, 1999). La mutation T1653 a été identifiée chez les patients ayant une forme d'hépatite B fulminante (Ogata *et al.*, 1993; Uchida *et al.*, 1997), dans le cas des réactivations graves des hépatites B chroniques et l'augmentation du risque de CHC chez les patients AgHBe négatif infectés par le HBV de génotype C (Ito *et al.*, 2006).

I.5.2.4. Les mutations précore / core et les hépatites sans AgHBe

La région précore est couverte par les positions 1814 et 1901. Au cours de l'évolution clinique normale d'une hépatite chronique B avec un virus sauvage (**Figure 10A**), l'arrêt de la détection de l'AgHBe s'accompagne de la production d'anticorps anti-HBe. C'est la séroconversion « e » qui se traduit par la diminution importante de la réplication et le virus peut devenir indétectable dans le sérum. En 1993, Brunetto et ses collaborateurs ont identifié pour la première fois un groupe de patients italiens présentant une absence de production d'antigène HBe avec détection de l'ADN viral (Brunetto *et al.*, 1993). Ces souches virales isolées chez ces patients ont été appelées des mutants préC (**Figure 10B**). Leur caractérisation a montré une substitution de la guanosine (G) par l'adénosine (A) à la position 1896 (**Figure 10B**) qui se traduit par l'apparition du codon stop TAG à la fin de PréC. La présence de ce codon stop provoque l'arrêt de la synthèse du tolérogène AgHBe. La production de la protéine du Core n'est guère altérée et l'ADN viral reste détectable dans le sérum. Les patients infectés par les virus mutants préC possèdent l'anticorps anti HBe dont la présence se justifie par la cohabitation à un moment donné entre le virus sauvage et le virus muté. Les mutants PréC sont répliquatives et transmissibles. La mutation G1896A a été identifiée chez des patients victimes d'hépatite sévère, fulminante et CHC. Leur virulence serait liée à l'absence de production du tolérogène AgHBe.

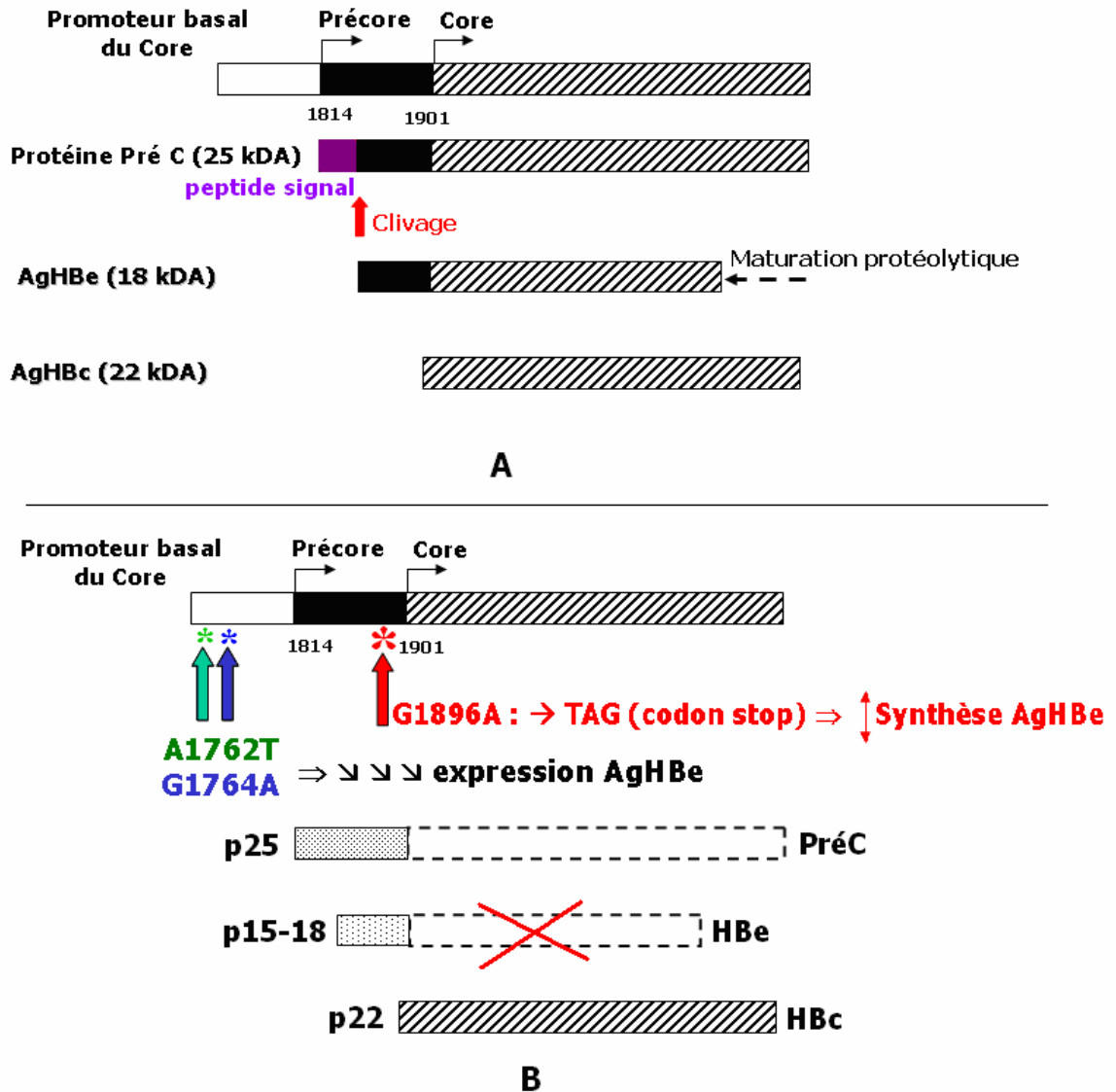


Figure 10 : Les gènes codant les protéines HBc et HBe et émergence des mutants pré-C.

A : expression des AgHBe et AgHBc chez des souches sauvages. **B** : les mutations A1762T en vert et G1764A en bleu provoquent une diminution de la production d'AgHBe tandis que la mutation G1896A en rouge occasionne une absence de production dudit Antigène malgré la répllication virale (Brunetto *et al.*, 1993)

I.5.2.5. Les mutations du gène X et le carcinome hépatocellulaire (HCC)

Le gène X (1374 – 1838) chevauche avec les parties des régions codant le promoteur basal du core et précore. Les mutations identifiées dans ces régions affecteraient aussi la fonction de la protéine X. En effet, la mutation T1653 transforme l'aa histidine à la tyrosine sur le codon 94 de la protéine X ; codon important dans le domaine antigénique immunodominant et jouant un

rôle central dans le processus de transactivation (Sirma *et al.*, 1999; Stemler *et al.*, 1990). La mutation V1753 et double mutation T1762/A1764 provoquent le changement isoleucine à asparagine/sérine/thréonine sur le codon 127, lysine à la méthionine sur le codon 130, valine à Isoleucine à la position 131 respectivement. Ces changements d'acides aminés dans la protéine X affectent aussi sa fonction. En plus des mutations BCP et précoces qui affectent la protéine X, d'autres mutations ont été encore identifiées dans la protéine X comme étant associées au CHC : la substitution de la sérine par l'alanine aux positions 31 (T1464G) (Yeh, 2000) et 38 (C1485T) (Muroyama *et al.*, 2006).

I.5.2.6. Les mutations du gène de la Polymérase et résistance aux antiviraux (Figure 11)

La polymérase virale est la cible des nombreux analogues nucléotidiques conçus pour le traitement des hépatites virales B. La sélection des mutants de résistance dépend de certaines cellules et des facteurs viraux. Au cours du traitement antiviral avec les analogues nucléotidiques, le virus acquiert des mutations qui vont lui conférer une résistance à la molécule choisie. Les mutants résistants à la lamivudine possèdent des mutations M204V ou la substitution I dans le motif YMDD du domaine C de la reverse transcriptase. Comme ces substitutions affectent l'activité enzymatique et la capacité répliquative, les mutations compensatoires V173L et L180M ont été décrites, restaurant un niveau de la capacité répliquative (Delaney *et al.*, 2003). Les mutants résistants à l'adéfovir possèdent les mutations N236T et/ou A181V dans les domaines D et B respectivement (Angus *et al.*, 2003; Villeneuve *et al.*, 2003). La substitution A181T a été aussi décrite comme mutant de résistance à l'adéfovir, mais sa signification biologique et clinique reste à déterminer. Les mutants résistants à l'entécavir ont une histoire d'échec thérapeutique à la lamivudine et présentent une combinaison de substitutions I169T et M250V ou T184G et S202I. La résistance à la telbivudine est associée à la substitution M204I (Lai *et al.*, 2005). La substitution A194T, décrite en plus des mutations de résistance à la lamivudine chez des patients co-infectés HIV et HBV et traités par le ténofovir et la lamivudine, conférerait une résistance au ténofovir (Sheldon *et al.*, 2005); mais cette description n'a pas été confirmée par d'autres études (Delaney *et al.*, 2006).

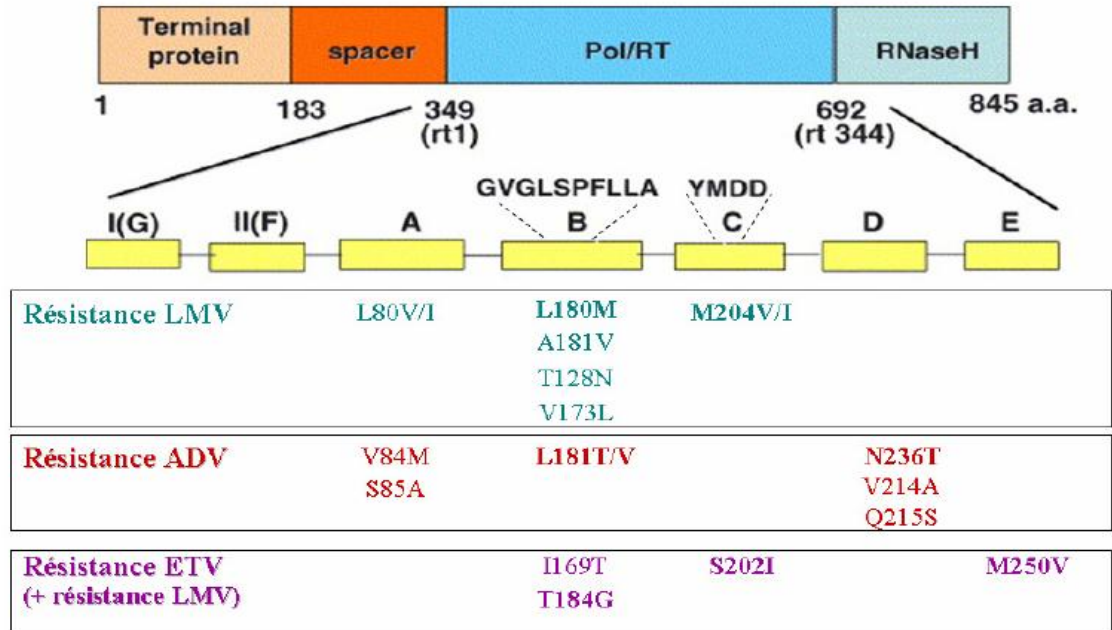


Figure 11 : Les mutations dans le gène polymérase et la résistance aux antiviraux.

Lamivudine (LMV), Adéfovir (ADV) et l'Entécavir (ETV). (Zoulim, 2002)

I.6. Diagnostic virologique de l'infection par le virus de l'hépatite B

Le diagnostic virologique de l'infection à VHB repose sur les techniques sérologiques et les techniques moléculaires

I.6.1. Le diagnostic sérologique

Il existe trois principaux systèmes antigènes / anticorps : AgHBs / Ac anti-HBs, AgHBc / Ac anti-HBc, AgHBe / Ac anti-HBe.

I.6.1.1. Le système HBs

L'antigène de surface (AgHBs) est l'antigène le plus précoce de ce virus qui se retrouve dans le plasma et y persiste dans le cas du portage chronique du VHB. C'est le marqueur du diagnostic de l'infection à VHB. L'AgHBs est le premier marqueur retrouvé dans le sang, environ 1 à 3 mois après la contamination. C'est le marqueur de l'infection par le VHB. Il est détecté dans le sérum à l'aide de tests sérologiques immunoenzymatiques, de type ELISA. Pour

tout échantillon présentant l'AgHBs positif pour la première fois, des tests de neutralisation (avec des anticorps anti-HBs) permettent de renforcer la spécificité de la réaction et de confirmer le résultat. De plus, les modifications conformationnelles induites par les mutations dans le gène S peuvent altérer la reconnaissance de l'AgHBs par les tests de dépistage de routine. Les anticorps anti-HBs apparaissent progressivement au cours de l'élimination virale. L'apparition de ces anticorps signe, soit l'arrêt de la réplication virale avec guérison, soit une protection post-vaccinale. Ils sont recherchés dans le sérum par des techniques ELISA.

I.6.1.2. Le système HBc

L'antigène HBc n'est pas excrété dans le sérum. Sa détection n'est pas réalisée en pratique courante. Les anticorps anti-HBc apparaissent précocement dans le sérum, quelle que soit l'évolution de la maladie. Ce ne sont pas des anticorps protecteurs mais seulement les témoins d'une infection par le VHB. La fraction IgM anti-HBc peut être recherchée et dosée parallèlement aux Ac anti-HBc totaux, par ELISA. La fraction IgM anti-HBc est détectée dans les primo-infections mais est inconstamment retrouvée lors des réactivations.

I.6.1.3. Le système HBe

L'antigène HBe est détectable dans le sérum par ELISA mais aussi par RIA et par immunodiffusion. Il témoigne d'une réplication virale. La disparition de l'AgHBe, mais surtout l'apparition des Ac anti-HBe sériques sont en faveur d'une évolution favorable. Cependant, la présence d'Ac anti-HBe ne suffit pas pour affirmer de l'absence de la réplication virale. Dans certains cas, malgré la présence d'Ac anti-HBe, l'ADN viral reste détectable et l'infection poursuit son évolution.

I.6.2. Les techniques de diagnostic moléculaire du virus de l'hépatite B

Ces techniques regroupent les méthodes moléculaires de détection et quantification de l'ADN VHB et les techniques de détection des variants.

I.6.2.1. Techniques de détection et de quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B

La présence d'ADN sérique traduit la production de virions complets infectieux qui passent dans la circulation sanguine, et reflète donc l'intensité de la réplication virale intra-hépatocytaire. La charge virale permet d'évaluer la progression de l'infection et décider d'un traitement.

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de développer de nombreux tests « maison » et commerciaux avec des seuils de détection et quantification de plus en plus faible.

I.6.2.2. Techniques de détection des variants du virus de l'hépatite B

➤ Génotypes

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour identifier les génotypes du VHB, le choix de la technique dépendant de l'objectif des études menées.

a. Séquençage et analyse phylogénétique

Actuellement, le séquençage du génome entier du VHB et l'analyse phylogénétique constituent la méthode de référence pour le génotypage des souches de VHB. La comparaison des séquences du génome entier et du gène S a montré que les séquences S permettaient également d'identifier précisément les génotypes de A à H. Cependant, si la région S est la plus fiable pour le génotypage, elle ne permet pas de détecter les éventuelles recombinaisons entre les souches de VHB (Niesters *et al.*, 2005).

b. Méthodes alternatives

D'autres techniques exploitant la variabilité génétique du VHB ont été développées. Si elles sont plus sensibles que la technique de séquençage pour la détection des mélanges de génotypes, elles reposent sur l'analyse d'une séquence nucléotidique ou protéique très courte et donnent donc des résultats moins fiables. De plus, ces méthodes nécessitent d'être adaptées

chaque fois qu'on identifie un nouveau génotype ou une nouvelle mutation. Parmi ces techniques, on distingue :

- L'hybridation sur support solide à l'aide de sondes spécifiques dans la région préS1
- L'analyse par polymorphisme de restriction
- L'amplification de la région conservée des gènes préS1/S par PCR

I.6.2.3. Recherche des variants S

La majorité des variants S porte des mutations dans la MHL de l'AgHBs.

La méthode de référence pour l'étude des variants repose sur le séquençage de la région d'intérêt du fait du nombre et de la variété des mutations rencontrées. Il n'existe pas actuellement de technique consensus pour l'analyse de ces mutants. Les amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage doivent être choisies dans des régions conservées entre les génotypes. Chemin et al. (Chemin *et al.*, 2001) ont développé une méthode d'amplification par PCR nichée et de séquençage du gène S qui a permis la recherche de mutations dans la région antigénique majeure de l'AgHBs, quel que soit le génotype du VHB. La trousse commercialisée par Bayer Diagnostics (Trugene HBV Kit) permet la détection des mutations dans le cadre de lecture du gène S (aa 100 à 227) simultanément à l'identification du génotype du VHB.

I.6.2.4. La recherche des variants précore

La recherche de mutants dans la région préC ou dans le promoteur du core au cours des hépatites chroniques permet de distinguer les patients en rémission des patients infectés par un mutant précore. Les mutations sont mises en évidence soit par séquençage, à l'aide de techniques « maison », soit par des méthodes rapides, standardisées, mais permettant seulement la détection de mutations bien définies (trousses INNO-LiPA HBV PreCore, Innogenetics ; Smitest: HBV core promoter and precore mutation detection kits, Genome Science Laboratories).

I.6.2.5. La recherche des variants dans la polymérase

La méthode de référence pour rechercher ces mutations repose sur le séquençage du domaine transcriptase inverse, qui permet de détecter l'ensemble des mutations de résistance, quel que soit le traitement antiviral utilisé. Les principales mutations de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir sont indiquées sur la **Figure 11**.

Deux trousse disponibles sur le marché permettent de détecter les mutations soit par hybridation du produit d'amplification du gène P avec des sondes spécifiques (test INNO-LiPA HBV DR, Innogenetics), soit par séquençage direct du produit de PCR (trousse Trugene HBV, Bayer Diagnostics). Le test d'hybridation ne détecte dans la version actuelle que les mutations de résistance connues à la lamivudine. En revanche, la trousse de séquençage-génotypage permet de rechercher de nouvelles mutations à la lamivudine ou à l'adéfovir.

I.6.2.6. Recherche des formes persistantes de l'ADN du virus de l'hépatite B

Lors de la phase de rémission d'une hépatite chronique, l'ADN viral peut persister dans le noyau des cellules infectées, intégré dans le génome cellulaire ou sous forme de cccDNA.

Détection et/ou quantification du cccDNA

Responsable des réactivations lors de l'arrêt d'un traitement ou du fait d'une immunodépression, le cccDNA représente un marqueur important pour le suivi des patients et l'évaluation de l'efficacité d'un traitement. D'abord recherché par Southern Blot, le cccDNA est actuellement détecté par des techniques de PCR basées sur l'utilisation d'amorces spécifiques, méthodes plus simples d'utilisation et plus sensibles. Les amorces sont choisies de part et d'autre du gap du génome viral, de sorte que seul l'ADN double brin fermé de manière covalente soit amplifié. Le développement de PCR en temps réel sur ce principe permet de quantifier le cccDNA.

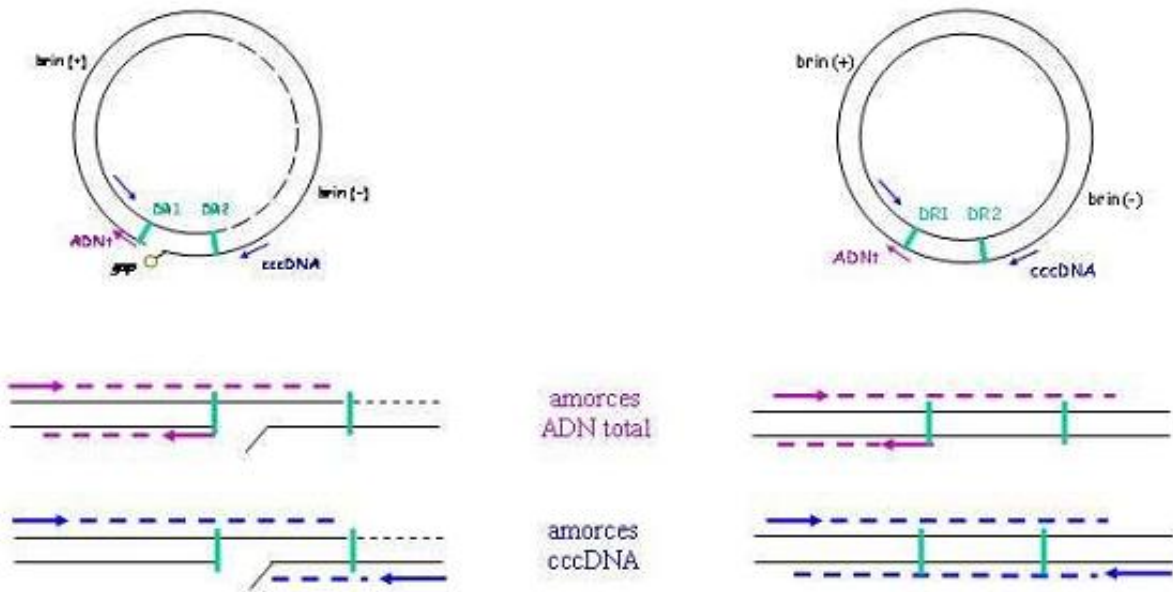


Figure 12 : Principe des PCR permettant l'amplification sélective des cccDNA.

Une méthode alternative reposant sur l'amplification du signal a été développée (Kwiatkowski *et al.*, 1999). Ce test appelé invasive signal amplification reaction (Invader assay) utilise deux sondes partiellement chevauchantes qui s'hybrident sur une séquence cible du génome viral. Une endonucléase hydrolyse la structure ainsi formée et la courte séquence d'ADN libérée est amplifiée par PCR en temps réel.

Détection de l'ADN intégré

Elle s'effectue essentiellement à partir de biopsies hépatiques, dans le cadre de protocoles de recherche. La plupart des techniques décrites reposent sur l'amplification des jonctions VHB - génome humain par PCR puis l'analyse par séquençage ou hybridation par Southern Blot.

II.6.3. Les méthodes de génération d'arbres phylogénétiques

La phylogénie moléculaire a pour but de comprendre l'histoire évolutive d'une famille de gènes par la comparaison des séquences dites homologues, c'est-à-dire qui ont dérivé par des divergences successives à partir d'une séquence ancestrale commune. Les progrès considérables de la biologie moléculaire et des techniques statistiques ont largement contribué au développement de cette discipline.

Les arbres phylogénétiques sont générés à partir des alignements multiples des séquences des souches étudiées et des souches de référence tirées de GENBANK. Il existe trois méthodes de reconstruction des arbres phylogénétiques :

1- Les méthodes phénétiques basées sur les distances génétiques : méthode "du plus proche voisin" (*Neighbor-Joining*) et UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

2- La méthode cladistique : le maximum de parcimonie.

3- Les méthodes probabilistes : le maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*) et analyses Bayésiennes.

Chacune de ces méthodes recherche l'arbre optimal selon des critères différents. Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé deux méthodes de construction d'arbres : la méthode "du plus proche voisin" (*Neighbor-Joining*) et la méthode du maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*). Il est important de noter qu'aucune méthode de construction d'arbres phylogénétiques n'est irréprochable. La comparaison des topologies des arbres obtenus par différentes méthodes est recommandée et seules les topologies conservées d'une méthode à l'autre peuvent être considérées avec intérêt. Par ailleurs, pour l'évaluation plus précise des arbres, des tests de contrôle de fiabilité des résultats, comme le test de re-échantillonnage (*bootstrap*) sont utilisés. Ce test permet de déterminer, grâce à des valeurs statistiques, les éléments topologiques et les groupements de séquences qui résistent au re-échantillonnage (groupements « robustes ») et qui sont dignes d'intérêt.

A partir des alignements générés, les arbres phylogénétiques sont construits en utilisant à la fois la méthode des distances et celle du maximum de vraisemblance. Les arbres basés sur les distances génétiques sont construits en suivant la méthode du « plus proche voisin » en utilisant le logiciel MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Les modèles de substitution de Jukes-Cantor et Dayhoff sont utilisés pour la détermination des distances entre

les séquences nucléotidiques. Les gaps présents dans les alignements sont supprimés par paires de séquences (*pairwise deletion*).

Les arbres basés sur la méthode du maximum de vraisemblance sont construits avec le logiciel PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) sous le modèle de substitution HKY85 (Hasegawa *et al.*, 1985). Le ratio de transition/transversion (Ts/Tv) de 8,0 est utilisé sans proportion de sites invariables, ni valeur discrète de gamma distribution entre les sites.

I.6.4. L'évaluation statistique de la robustesse des arbres phylogénétiques

Le « bootstrap » est un test d'évaluation statistique de la robustesse des topologies des arbres, par ré-échantillonnage au hasard et avec remise des données alignées. Afin d'obtenir une bonne évaluation, 1000 ré-échantillonnages ont été effectués (*bootstrap*). Le logiciel d'analyse phylogénétique génère à partir d'un jeu de séquences alignées, 1000 jeux « artificiels » de séquences alignées par tirages aléatoires avec remise des différentes colonnes de l'alignement original. Dans chaque jeu « artificiel », certaines colonnes de l'alignement original sont représentées plusieurs fois, tandis que d'autres ne sont pas présentes. On utilise ces 1000 jeux « artificiels » de données pour générer 1000 matrices de distances, puis 1000 arbres « artificiels ». Un arbre consensus est alors généré à partir de ces 1000 arbres « artificiels ». A chaque noeud de l'arbre consensus est affecté un pourcentage qui correspond à la proportion des arbres « artificiels » présentant ce noeud : c'est la valeur de "*bootstrap*", qui mesure la robustesse interne des différents nœuds observés. Il existe un seuil à partir duquel un nœud peut être considéré comme robuste. Le seuil considéré est généralement de 70%. C'est le seuil choisi dans les analyses faites au cours de cette étude.

I.7. Epidémiologie et prévention des hépatites B

Malgré l'existence d'un vaccin efficace, le VHB reste encore aujourd'hui un problème de santé publique mondiale. En effet plus 350 millions d'individus sont porteurs d'une hépatite chronique B (Lavanchy, 2004) et le VHB serait à l'origine de 500000 à 1,2 millions de morts par

an (Lee, 1997). L'OMS a défini trois zones géographiques, selon le taux d'infection de la population adulte (Lavanchy, 2004) (**Figure 8**).

➤ les zones de forte endémicité (> 8% de la population générale est infectée de manière chronique) : Afrique sub-saharienne, Asie du Sud-Est, Extrême-Orient, le bassin amazonien et certains pays d'Europe de l'Est. Dans cette zone, le risque d'acquérir l'infection au cours d'une vie entière est supérieur à 60% et la majorité des sujets sont contaminés à la naissance ou au cours des premières années de leur vie.

➤ les zones d'endémie intermédiaire ou d'endémie moyenne (2 à 7% de la population est infectée de manière chronique) : Europe du Sud et de l'Est, l'Amérique latine, l'Inde, le Japon, les pays du bassin méditerranéen. Dans cette zone, le risque d'infection est de 20 à 60 %.

➤ les zones de faible endémie (< 2% de la population est infectée de manière chronique) : Amérique du Nord, Europe de l'Ouest et du Nord. Dans ces régions, le taux d'infection est inférieur à 2 % et la contamination survient surtout à l'âge adulte.

I.7.1. L'infection par le VHB au Cameroun

I.7.1.2. Prévalence du VHB dans les populations humaines du Cameroun

Au Cameroun, les études réalisées sur la séroprévalence du VHB (détection de l'AgHBs) rapportent des résultats qui divergent de 5 à plus de 90% selon les auteurs, les zones d'études et les populations sélectionnées. Des très forts taux de séroprévalences ont été observés dans les cohortes de personnes infectées par le VIH et chez les enfants de moins de 5 ans souffrant du paludisme (**Tableau II**)

Tableau II : Séroprévalence du VHB au Cameroun.

Référence	Population Testée (Région)	Nbre sujets	% AgHBs
(Garrigue <i>et al.</i> , 1985)	Sujets > 4 ans (Garoua)	395	25.4
(Poveda <i>et al.</i> , 1986)	Sujets (15-44 ans) (Nkongsamba)	370	8.4
(Ndumbe & Njie, 1989)	Anémié (Yaoundé)	188	9.6
(Zekeng & Kaptue, 1990)	Donneurs de sang (CHU Yaoundé)	5980	11.72
(Ndumbe & Nyouma, 1990)	Drépanocytaires (3 transfusions)	76	12
	Témoins	62	11
(Rapicetta <i>et al.</i> , 1991)	âge du primaire	702	23.2
(Chiaromonte <i>et al.</i> , 1991)	Enfants école primaire	702	19.9
(Ndumbe <i>et al.</i> , 1992)	Femmes enceintes de Yaoundé	150	25.3
(Ndumbe <i>et al.</i> , 1993)	Pygmées Baka (Est Cameroun)	141	14.2
(Ndumbe <i>et al.</i> , 1994)	Femmes enceintes (rurales)	/	5.4
(Kowo <i>et al.</i> , 1995)	(pygmées et bantous) (Sud Cameroun)	168	7.2
(Mbanya <i>et al.</i> , 2003)	Donneurs de sang (CHU Yaoundé)	/	10.7
(Mulders <i>et al.</i> , 2004)	Cohorte VIH	/	91.4
	Enfants malades (paludisme)		64.7
(Kurbanov <i>et al.</i> , 2005)	pygmée de l'Est	174	7.5
	bantous	370	8.9
(Mogtomo <i>et al.</i> , 2009)	Donneurs de l'UD (1995-2004)	/	6.1-16
	Hopital Laquinitinie Douala		6.91
(Laurent <i>et al.</i> , 2010)	Personnes VIH positives	169	8.3
(Kouanfack <i>et al.</i> , 2012)	VIH + sous Lamivudine (HCY)	552	9.8
(Kfutwah <i>et al.</i> , 2012)	Femmes enceintes (population générale)	650	7.85
	Femmes enceintes VIH positif	301	9.3
	Femmes enceintes VIH négatif	349	6.59
(Zoufaly <i>et al.</i> , 2012)	Cohorte VIH+ (Rurale)	690	12.6%

CHU : Centre Hospitalier Universitaire, HCY : Hôpital Central de Yaoundé, UD : Université de Douala, VIH : virus de l'immunodéficience humaine.

I.7.1.3. Diversité génétique du VHB dans les populations humaines du Cameroun

Les études menées sur la diversité génétique du VHB décrivent une co-circulation des génotypes A et E. Certaines études ont fait mention de la circulation des rares génotypes D. Une importante diversité génétique est décrite au sein du génotype A. En plus, la forme recombinante A/E a été identifiée et on note aussi une forte fréquence d'infection mixte A et E (37%) dont la prévalence est plus importante chez les enfants.

En 2004, Mulders *et al.* (Mulders *et al.*, 2004) ont évalué la diversité génétique au niveau de la région PrÉS/S de 40 souches amplifiées chez les adultes VIH positif et les enfants souffrant du paludisme. Des 22 souches étudiées de la cohorte VIH positif, 81.81% (18/22) sont du génotype A et 18.2% (4/22) du génotype E. A l'inverse, on note 77.77% (14/18) de génotype E et 22.22% (4/18) génotype A chez les enfants. Les souches A isolées du Cameroun forment un cluster HBV/A'' distinct du HBV/A' rencontrés en Europe et aux Etats-Unis. La diversité au sein des souches A (1.87) isolées dans cette population est plus élevée que la totalité de la diversité (1.67) observée au sein du génotype E. Ce qui annonce dès lors la forte diversité qui existerait au sein des souches A du Cameroun et stipulerait la longévité de ces souches au sein de ladite population. Les souches du génotype A appartenaient aux sérotypes ayw1/2, ayw4, adw1/2 et adw4 tandis que la majorité des souches du génotype E appartenaient au sérotype ayw4 et une souche E du Cameroun du sérotype adw1/2.

Un an plus tard, Kurbanov et collaborateurs (Kurbanov *et al.*, 2005) ont obtenu 45.5% de HBV/A, 39.4% de HBV/E et 15.1% de HBV/D chez les bantous et 38.5% de HBV/A, 53.8% HBV/E et 7.7% HBV/D chez les pygmées de l'Est Cameroun. Les génotypes ont été déterminés par une technique immunoenzymatique (EIA) utilisant les anticorps monoclonaux spécifiques des épitopes de la région PrÉS2 (Usuda *et al.*, 1999). Les 4 génomes complets de A identifiés dans cette étude forment un cluster regroupant les souches du Cameroun permettant ainsi de décrire un nouveau sous génotype A3 du génotype A. Ces nouvelles souches sont caractérisées par 9 substitutions au niveau du génome ; ces substitutions sont : G1173A (activateur I-X du promoteur), C1473G, G1512A et C1703T (activateur II du promoteur du core), A2742G

(promoteur S1), C3021T, C3042T, T3076C et C3111T (promoteur S2). Trois sur quatre A3 ont présenté des substitutions dans la séquence de Kozak (1809-1812) (Ahn *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2004) et deux ont la double mutation (1762/1764) au niveau du promoteur basal du core. En plus, une forme recombinante entre HBV/A et HBV/E a été décrite dans cette étude.

En 2006, Olinger et collaborateurs (Olinger *et al.*, 2006) en étudiant la région preC/C ont décrit une fréquence globale de 63.4% de génotype A (avec prédominance chez les personnes VIH +) contre 36.6% pour le génotype E. ils ont aussi observé plus de 37% d'infection mixte (génotypes A et E) parmi lesquelles 79% identifiées chez les enfants. Partant sur le postulat de la circulation des génotypes A et E, la détermination des infections mixte A et E a été réalisée en utilisant deux amorces spécifiques exploitant l'insertion de 6 nucléotides dans le génome du génotype A.

En 2011, Hübschen *et al.* (Hubschen *et al.*, 2011) ont obtenu 79% de génotype A contre 21% de génotype E en étudiant le fragment S d'environ 815 nucléotides. Dans cette forte fréquence de VHB/A, un nouveau sous génotype nommé A7 est décrit. En plus les souches A5 ont été décrites pour la première fois au Cameroun.

En 2012, Kouanfack et collaborateurs (Kouanfack *et al.*, 2012) en étudiant 17 souches au niveau de la région polymérase ont obtenu 41.2% (7/17) de génotype A, 29.2% (5/17) de génotype E et 29.2% (5/17) de génotypes non identifiés.

I.7.1.4. Prévalence du VHB chez les primates non humains (PNH) du Cameroun

Quelques études mettent en évidence l'infection par le HBV chez quelques chimpanzés (*pan troglodytes troglodytes* et *pan troglodytes vellerosus*) et gorilles (*gorilla gorilla*) du Cameroun.

En 2000, MacDonald *et al.* (MacDonald *et al.*, 2000) ont rapporté la présence de l'AgHBs chez trois chimpanzés en captivité au Cameroun. Au cours de la même année, Grethe et

al. (Grethe *et al.*, 2000) ont rapporté la présence de l'AgHBs chez un gorille originaire du Cameroun.

En 2003, Starkman *et al.* (Starkman *et al.*, 2003) ont détecté la présence de l'AgHBs chez deux chimpanzés sur sept en captivité au centre d'accueil « Limbe Wildlife Center ». Ces deux chimpanzés appartenaient à deux sous espèces différentes (un de sous espèce *troglodytes* et l'autre de sous espèce *vellerosus*).

En 2012, Lyons *et al.* (Lyons *et al.*, 2012) ont obtenu 14.5% (9/62) chez les chimpanzés et 18,2% (2/11) chez les gorilles en amplifiant le gène S de l'ADN du VHB.

1.7.1.5. Diversité génétique du VHB chez les PNH au Cameroun

Quelques études menées chez les chimpanzés (*pan troglodytes troglodytes* et *pan troglodytes vellerosus*) et gorilles (*gorilla gorilla*) originaires du Cameroun ont permis d'isoler et de caractériser les souches de VHB infectant ces grands singes.

En 2000, Mac Donald *et al.* (MacDonald *et al.*, 2000) ont pu séquencer des souches de VHB chez les chimpanzés en captivité au Cameroun. Au cours de la même année, Grethe *et al.* (Grethe *et al.*, 2000) ont identifié et caractérisé un génome complet de Gorille originaire du Cameroun.

En 2003, Starkman *et al.* (Starkman *et al.*, 2003) ont caractérisé les souches identifiées chez deux chimpanzés sur sept en captivité au centre d'accueil « Limbe Wildlife Center ». Ces deux chimpanzés appartenaient à deux sous espèces différentes (un de sous espèce *troglodytes* et l'autre de sous espèce *vellerosus*).

En 2007, Makuwa *et al.* (Makuwa *et al.*, 2007b), dans une étude regroupant la République du Congo, le Gabon et le Cameroun ont obtenu quatre génomes complets des chimpanzés dont un originaire du Cameroun et précisément de la réserve du Dja.

En 2012, Lyons *et al.* (Lyons *et al.*, 2012), ont mis en évidence la possibilité de recombinaison entre le VHB infectant les chimpanzés et les Gorilles. Cette découverte démontre la possibilité de transmission inter espèce. Depuis longtemps, les souches du VHB formaient des clusters qui faisaient penser à une sélection liée à l'espèce. Toujours dans cette étude, on a noté une amplification avec les amorces de dépistage chez deux petits singes de l'ancien Monde dont un Mangabey aux joues grises et un Mandrill. Cette étude a ajouté 8 nouveaux génomes complets de grands singes dont six de chimpanzés et 2 des gorilles.

I.7.1.6. Transmission inter-espèces du VHB entre humains et PNH

Les données sur les VHB des PNH Africains sont très parcellaires. La comparaison des souches circulant chez les humains en Afrique subsaharienne et celles identifiées chez les grands singes ne permettent pas la confirmation des hypothèses suggérant une transmission des VHB entre les humains et les PNH.

I.7.2. Les principaux modes de transmission du virus de l'hépatite B

Quatre principales modes de contaminations ont été identifiées à savoir : i) la transmission parentérale et nosocomiale, ii) la transmission sexuelle, iii) la transmission verticale, iv) la transmission horizontale.

➤ La transmission verticale (périnatale ou materno-fœtale)

La transmission de la mère à l'enfant est un mode d'entretien de l'infection, surtout dans les régions de forte endémicité et notamment en Asie (Edmunds *et al.*, 1996). Elle se passe principalement au moment de l'accouchement par microtransfusions materno-fœtale ou par contact avec les liquides biologiques porteurs du virus (sécrétions cervicales et vaginales). La transmission in utero est très rare car le passage du virus à travers la barrière placentaire est exceptionnel. Elle peut arriver dans le cas d'une infection aiguë de la mère au cours du dernier trimestre de la grossesse (Poovorawan *et al.*, 1997). Dans ce cas, elle se passerait selon deux modes : par voie hématogène par infection des cellules endothéliales des capillaires du placenta,

ce qui représenterait le principal risque de transmission intra-utérine, ou par voie cellulaire par transmission transplacentaire de cellule à cellule. La transmission verticale est conditionnée par l'importance de la réplication du VHB chez la mère. En effet, les mères infestées et possédant l'AgHBe (marqueur traditionnel de la réplication virale) ont un risque de transmettre le virus à leurs enfants proche de 100%. Si l'AgHBe est absent, ce risque est moindre (10 à 15%). Le virus bien que présent dans le lait, les nouveau-nés correctement sérovaccinés peuvent être allaités sans conséquences.

➤ **La transmission horizontale**

En Afrique où l'infection par le VHB est endémique, la transmission horizontale au cours de la petite enfance reste la principale voie. L'infection se produit en milieu familial, dans les garderies d'enfants et à l'école. Elle se fait généralement par contact étroit des lésions ou des muqueuses avec le sang ou des sécrétions des plaies au cours des jeux d'enfants, ou de la pratique des sports de combat. La contamination par la salive se fait à travers les morsures ou d'autres effractions cutanées. Elle est aussi favorisée par les mauvaises conditions d'hygiène et la promiscuité (Martinson *et al.*, 1998; Zhevachevsky *et al.*, 2000). Le VHB peut être transmis au sein de la famille par utilisation des objets partagés tels que les brosses à dents ou les rasoirs où il peut être présent à forte concentration et y résisté pendant longtemps.

➤ **La transmission sexuelle**

La contamination par voie sexuelle (par le sperme ou les sécrétions vaginales) est une source majeure de propagation de l'infection du VHB dans tous les pays du monde. Ce mode de contamination est important chez les homosexuels. Il est également fréquent chez les hétérosexuels aussi bien dans le sens homme-femme que femme-homme. Cette voie de transmission reste le principal mode de contamination dans les pays occidentaux.

➤ **La transmission parentérale et nosocomiale**

Le chef de file de ce mode de contamination est la transfusion sanguine ou des dérivés sanguins. Les efforts consentis et les nouvelles technologies (dépistage de l'AgHBs et détection de l'ADN VHB) utilisées dans les banques de sang ont permis de réduire de façon significative les risques de contamination à travers la transfusion. Le risque transfusionnel est évalué aux alentours de 1/100000 en Occident et particulièrement en France (Courouce & Pillonel, 1996). Les professionnels de la santé, les hémophiles, les thalassémiques, les drépanocytaires, les hémodialysés et les toxicomanes restent et demeurent les groupes à risque.

I.8. Physiopathologie de l'infection par le virus de l'hépatite B

I.8.1 Immunopathologie et mécanisme d'élimination virale

Le VHB n'est pas directement cytopathogène. Les lésions hépatiques sont dues à la réponse immune de l'hôte qui induit une inflammation hépatique et une lyse des cellules infectées. La gravité de ces lésions et l'évolution de la pathologie sont déterminées par l'intensité du conflit entre le virus et les défenses immunitaires de l'hôte. De plus, la rapidité de l'activation de la réponse immune, son intensité et son efficacité vont conditionner l'évolution de l'infection. Une réponse immune précoce et efficace permettra le contrôle de la réplication virale et sera associée à la guérison. En revanche, une réponse immune déficiente conduira à la persistance virale.

La réponse immune non spécifique, assurée par les macrophages, les neutrophiles, les cellules NK et NKT, est la plus précoce (Dienes *et al.*, 1987). Elle entraîne la formation de lésions nécro-inflammatoires.

Puis, les défenses immunitaires spécifiques entrent en action. Les cytokines sécrétées par les cellules NK et les macrophages recrutent les lymphocytes T helper 1 (Th1), principaux effecteurs de la réponse cellulaire. La réponse Th1 induit l'apparition des lymphocytes T cytotoxiques (cytotoxic T lymphocytes: CTL), responsables de la lyse des hépatocytes infectés,

et coordonne l'activité des cellules B, qui produisent les anticorps neutralisants (Ac anti-HBs). Ces anticorps permettent l'élimination des particules virales libres et empêchent la propagation du virus à d'autres cellules. Le pic de cette réponse est associé chez la plupart des patients à la clairance de l'AgHBs sérique. La réponse CTL est dirigée contre des épitopes des protéines de core, polymérase et antigène de surface (Bertoni *et al.*, 1997a; Maini *et al.*, 1999; Rehermann *et al.*, 1995a; Rehermann *et al.*, 1995b).

Parfois, la réponse immune cellulaire est incomplète ou inadaptée. Elle ne parvient pas à éliminer complètement la propagation du virus dans les hépatocytes, soit du fait de facteurs viraux, soit du fait de facteurs propres à l'hôte (Chisari & Ferrari, 1995; Hadziyannis, 1995; Lok, 2000) et conduit alors à une infection chronique ou persistante.

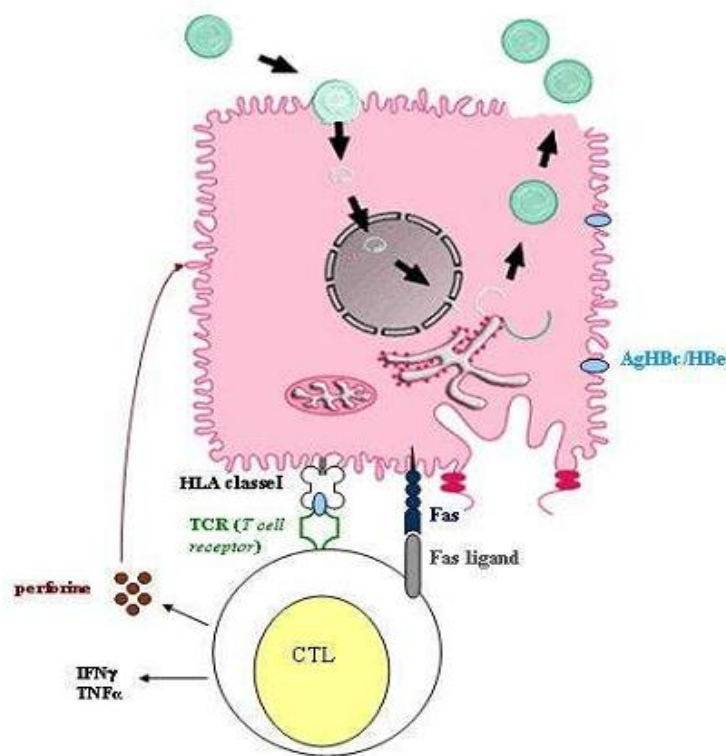


Figure 13 : Réponse cellulaire T cytotoxique.

La lyse des hépatocytes infectés est due aux granules cytotoxiques (notamment les perforines) et au système Fas qui active l'apoptose cellulaire (Bertoni *et al.*, 1997a; Maini *et al.*, 1999; Rehermann *et al.*, 1995a; Rehermann *et al.*, 1995b).

I.8.2 Mécanismes de la persistance virale

I.8.2.1. Les facteurs propres à l'hôte

L'âge de l'hôte au moment de l'infection est déterminant puisqu'il est corrélé à la maturité du système immunitaire. La proportion de cas symptomatiques de l'hépatite B aiguë augmente avec l'âge, alors que le risque de passage à une infection chronique diminue. Ainsi, l'infection acquise à la naissance est fréquemment asymptomatique mais évolue dans 90 % des cas vers la chronicité. L'évolution vers la chronicité concerne 25 à 50 % des infections acquises entre 1 et 5 ans et seulement 5 à 10 % des infections acquises à l'âge adulte (Chang, 2000; Hyams, 1995; McMahon *et al.*, 1985; Ranger-Rogez *et al.*, 2002). De plus, chez les patients infectés en période néonatale, la phase initiale de l'infection peut s'étendre sur des années (entre 10 et 30 ans) alors que chez les sujets infectés à l'âge adulte, elle dure seulement de quelques semaines à quelques mois (Hadziyannis, 1995; Lee, 1997; Lok, 2000).

Le risque de passage à la chronicité est également augmenté chez les immunodéprimés, les diabétiques et les hémodialysés.

I.8.2.2. Facteurs viraux

➤ Induction d'une immunotolérance

L'AgHBe semble jouer un rôle dans la persistance virale, notamment en induisant une déplétion des cellules Th1 (Milich *et al.*, 1990; Milich *et al.*, 1997). Il a été montré que des enfants nés de mères AgHBe- progressaient le plus souvent vers une infection chronique, alors que des enfants nés de mères AgHBe+ développaient une hépatite aiguë, voire fulminante, mais n'évoluaient que très rarement vers une forme chronique (Beath *et al.*, 1992; Karayiannis *et al.*, 1995; Kosaka *et al.*, 1991; Milich *et al.*, 1990).

➤ **Inhibition de la réponse cellulaire aux cytokines**

Des expériences *in vitro* ont montré que des protéines du VHB sont impliquées dans la moindre réponse des hépatocytes infectés aux cytokines. La partie N-terminale de la polymérase virale inhibe la réponse cellulaire aux IFN γ et α (Foster *et al.*, 1991) et la protéine de capsid semble inhiber la transcription du gène de l'IFN β (Whitten *et al.*, 1991).

➤ **Mutations d'échappement à la réponse immunitaire**

Des mutants dans les épitopes antigéniques des protéines de surface peuvent être sélectionnés sous la pression de la réponse immune, après vaccination ou après immunothérapie passive. Ils sont moins immunogènes que les virus sauvages et tendent à échapper aux défenses immunitaires (Bertoni *et al.*, 1997b; Waters *et al.*, 1992). Des mutations au niveau des épitopes CTL permettraient au VHB d'échapper à la réponse cytotoxique (Bertoletti *et al.*, 1994), mais la sélection de tels mutants survient rarement lors de l'infection chronique (Rehermann *et al.*, 1995a; Rehermann *et al.*, 1995b).

➤ **Réplication dans des réservoirs extra-hépatiques**

Le virus de l'hépatite B a un tropisme hépatocellulaire, mais il a également été retrouvé dans d'autres tissus, comme la moelle osseuse, le pancréas, les reins, la rate, le cœur et la peau (Yoffe *et al.*, 1990). Ceci suggère l'existence de sites de multiplication extra-hépatiques du VHB, inaccessibles à l'action directe des CTL ou exprimant faiblement les molécules HLA nécessaires à la présentation des antigènes viraux aux cellules du système immunitaire. D'une part, ces réservoirs contribueraient à la pérennisation de l'infection, mais d'autre part, permettraient une stimulation continue de la réponse immune, protégeant ainsi les patients des réinfections.

I.9. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B

I.9.1. Hépatite aiguë

Dans environ 70 % des cas, l'infection aiguë est asymptomatique. L'apparition des signes cliniques est liée à l'âge : l'infection est le plus souvent asymptomatique chez le jeune enfant (McMahon *et al.*, 1985). Le tableau clinique habituel comporte schématiquement trois phases :

- la phase d'incubation, de 4 à 30 semaines;
- la phase pré-ictérique, peu spécifique, inconstamment marquée par une asthénie, un syndrome pseudo grippal, des troubles digestifs modérés, une éruption cutanée inconstante;
- la phase ictérique, associant ictère, hépatomégalie dans 50 % des cas et splénomégalie dans 25 % des cas. L'ictère survient 1 à 2 semaines après le contage et persiste 2 à 6 semaines.

Dans tous les cas, la phase aiguë est marquée par une élévation nette du taux de transaminases. Dans 90 % des cas, la réponse immunitaire de l'hôte, vigoureuse et efficace, permet la résolution de l'infection, avec disparition des signes cliniques (l'asthénie peut cependant persister plusieurs semaines) et normalisation des transaminases. La séroconversion HBe (négativation de l'AgHBe et apparition des anticorps anti-HBe) annonce une évolution favorable de l'infection. Puis, une immunité durable s'instaure grâce à l'apparition des anticorps dirigés contre l'AgHBs.

Cependant, une fois sur mille (Bernuau *et al.*, 1986; Nunez-Martinez *et al.*, 2003), la réponse immunitaire de l'hôte devient excessive et entraîne la destruction massive des hépatocytes. Cette forme grave, appelée hépatite fulminante, conduit au décès dans 80 % des cas en l'absence de greffe hépatique.

I.9.2. Hépatite chronique

Le passage à la chronicité est défini par la persistance de l'AgHBs au-delà de 6 mois. Elle est liée à l'incapacité du système immunitaire de l'hôte à éliminer totalement le virus. Il a été montré que la réponse cellulaire, intense dans l'hépatite B aiguë, est déficiente ou quasi-indétectable au cours des hépatites B chroniques (Sobao *et al.*, 2002). L'infection chronique est

en général asymptomatique (70 à 90 % des cas) et n'est souvent découverte que tardivement, au stade de cirrhose voire de carcinome hépatocellulaire. Elle évolue classiquement en quatre phases (Lok & McMahon, 2001) à savoir : l'immunotolérance, la clairance immune, la rémission ou phase d'équilibre et l'élimination de l'antigène HBs.

I.9.2.1. La phase d'immunotolérance

Elle se caractérise par un état de tolérance immunitaire vis à vis des cellules infectées. La multiplication active du virus se traduit par la présence des marqueurs de réplication virale (AgHBs, AgHBe et ADN du VHB) à des taux élevés dans le sérum. A cette phase, l'individu est très contagieux. Du fait de la tolérance immunitaire, les lésions hépatiques de nécrose et d'inflammation sont absentes et les transaminases restent normales. Cette phase dure entre 1 et 15 ans, en fonction de l'âge de contamination et du statut immunitaire du patient.

I.9.2.2. La phase de clairance immune

Le conflit entre la réplication du virus et la réponse immune aboutit à la formation de lésions nécro-inflammatoires. Ce conflit se traduit par une diminution des concentrations sériques de l'ADN du VHB et une élévation des transaminases. L'examen de la biopsie hépatique révèle des lésions d'hépatite chronique active. A ce stade, l'initiation d'un traitement antiviral permet de bloquer la réplication virale et de réduire les lésions tissulaires.

I.9.2.3. La phase de rémission ou phase d'équilibre

Lorsque la réponse immune n'est pas assez vigoureuse pour éliminer tous les hépatocytes infectés, un équilibre s'installe entre réplication virale et défense immunitaire. Spontanément, ou sous l'effet de traitements antiviraux, le système immunitaire parvient à contrôler l'infection: le virus se réplique à bas bruit dans les hépatocytes et la faible expression des antigènes viraux (notamment l'AgHBc) réduit l'attaque des cellules infectées par les CTL. Cette phase se caractérise par la séroconversion HBe (taux de séroconversion annuel: 10 – 20 % (Lok *et al.*, 1987), la diminution de la charge virale sérique en dessous de 10⁴ copies/mL et la normalisation des transaminases correspondant à une diminution des lésions hépatiques (Fattovich *et al.*, 1986; Hsu *et al.*, 2002; Sanchez-Tapias *et al.*, 1985). C'est à ce stade que la réplication des mutants précoces, jusqu'alors quasi-espèce minoritaire, est favorisée par la pression immunitaire (Hadziyannis, 1995).

Le plus souvent, la réplication virale devient indétectable après quelques mois et le patient entre dans une phase de portage prolongé asymptomatique de l'AgHBs ou hépatite chronique persistante. Deux types de populations cellulaires sont retrouvés dans le tissu infecté: des cellules contenant du cccDNA, qui peuvent être à l'origine d'une réactivation virale (Davis *et al.*, 1984; Fattovich *et al.*, 1990; Hsu *et al.*, 2002), et des cellules contenant le génome intégré du VHB, pouvant être responsable des phénomènes de carcinogénèse. Spontanément, ou suite à un traitement immunosuppresseur, des épisodes de réactivation peuvent survenir, avec réapparition d'une virémie détectable (supérieure à 10⁵ copies/mL) et augmentation des transaminases. L'AgHBe se repositivise (5 à 10 % des cas), excepté dans le cas d'une réactivation due à un mutant précocore (20 à 30 % des cas) (Hsu *et al.*, 2002).

Dans 10 à 20 % des cas, les hépatites chroniques restent actives, avec une destruction massive des hépatocytes. Les transaminases sont élevées et sont associées à la persistance de l'AgHBe. Progressivement, les cellules détruites sont remplacées par celles du tissu cicatriciel et l'hépatite évolue vers la cirrhose (Lok, 2000) (incidence annuelle de survenue : 2 à 5,4 % (Fattovich *et al.*, 1991; Ikeda *et al.*, 1998). Il en résulte une insuffisance hépatocellulaire qui s'aggrave avec le temps et aboutit à la mort du malade (Sheen *et al.*, 1985).

I.9.2.4. La phase d'élimination de l'antigène HBs

Après plusieurs années, on peut observer la disparition de l'AgHBs (incidence d'environ 1 % par an), et éventuellement, l'apparition d'Ac anti-HBs. Le plus souvent, seuls les Ac anti-HBc restent positifs, témoignant d'un contact ancien avec le VHB, mais il arrive que tous les marqueurs sérologiques soient absents.

I.9.3. Carcinome hépatocellulaire (CHC)

Il s'agit d'une tumeur diffuse du foie. L'évolution vers un CHC est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes, suggérant un rôle possible des androgènes dans la carcinogénèse (Beasley, 1988; McMahon *et al.*, 1990). Elle est favorisée par une consommation excessive d'alcool, l'immunodépression et les coinfections par d'autres virus hépatotropes (VHC et VHD) (Benvegnu *et al.*, 1994; Fattovich *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 1997).

Les mécanismes de l'hépatocarcinogénèse induite par le VHB sont inconnus. L'hypothèse la plus probable implique la protéine X, qui est capable de transactiver des gènes

cellulaires associés à la prolifération et/ou la différenciation cellulaire (Feitelson, 1999; Wu *et al.*, 2002; Yeh, 2000). Les protéines d'enveloppe semblent aussi jouer un rôle dans le développement de CHC. En effet, il semble que l'accumulation intracellulaire de protéine L, voire de protéine M, soit associée au développement de cancer (Tai *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1997). L'hépatocarcinogénèse pourrait également être induite par l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. Cette intégration survenant de façon aléatoire, elle peut interférer avec l'expression d'oncogènes ou de gènes impliqués dans la division cellulaire. Toutefois, cet événement est rare et constituerait donc une étiologie mineure des CHC in vitro-induits. Par ailleurs, la régénération continue et forcée des hépatocytes détruits par le système immunitaire pourrait favoriser l'émergence de mutations cellulaires, et par conséquent, de CHC (Block *et al.*, 2003).

I.10. Traitements des hépatites B chroniques

Le but théorique du traitement de l'infection B chronique est l'éradication complète du virus. Cependant, un obstacle majeur à la guérison tient à la persistance du génome viral dans les cellules infectées, sous forme intégrée ou sous forme superenroulée, qui est responsable des réactivations observées à l'arrêt du traitement. La priorité thérapeutique est donc plutôt de supprimer durablement la réplication virale et de limiter l'atteinte hépatique, afin de ralentir la progression vers la cirrhose et l'hépatocarcinome. Les traitements sont donc indiqués dans les hépatites B chroniques histologiquement prouvées, avec une réplication virale détectable, quel que soit le niveau des transaminases.

L'efficacité thérapeutique est évaluée par la négativation de l'ADN du VHB et la séroconversion HBe (réponse combinée) mais aussi par la séroconversion HBs et la normalisation des transaminases accompagnée d'une amélioration histologique (Niederau *et al.*, 1996; Tine *et al.*, 1993). Il est désormais établi que les patients porteurs d'un virus «sauvage» (patients AgHBe+) répondent mieux aux traitements que les patients infectés par un mutant précore (patients AgHBe-). La thérapie est donc adaptée en fonction du profil sérologique des patients. Deux types de traitements antiviraux sont actuellement utilisés : les interférons et les analogues nucléosidiques/nucléotidiques.

I.10.1. Les interférons

Physiologiquement impliqué dans la lutte contre les infections virales, l'interféron α est tout indiqué dans le traitement des hépatites B chroniques. Il associe une action antivirale directe, par inhibition de la synthèse des ARN viraux, à des propriétés immunomodulatrices, par augmentation de l'expression des molécules HLA de classe I et stimulation de la réponse T (Niederau *et al.*, 1996; Tine *et al.*, 1993). Ses principaux inconvénients sont ses nombreux effets secondaires (notamment une cytolyse hépatique, limitant son utilisation chez les cirrhotiques) et sa courte demi-vie. La pegylation (couplage avec un groupement éthylène glycol) permet d'augmenter la durée de vie de l'interféron et améliore sa tolérance.

Un certain nombre de facteurs sont prédictifs d'une faible réponse à l'IFN α standard (Hadziyannis, 1995; Thomas *et al.*, 1991): une faible charge virale, des transaminases élevées, les infections acquises à la naissance ou lors de la petite enfance et le statut AgHBe.

I.10.2. Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques

Ils inhibent la réplication du VHB en s'incorporant à la place des nucléosides ou nucléotides naturels lors de la synthèse de l'ADN viral par la polymérase.

➤ **La lamivudine**

Elle possède une très bonne tolérance et a une puissante activité antivirale. Cependant, son action est virostatique et elle n'agit pas sur le pool d'ADN superenroulé présent dans les hépatocytes infectés.

➤ **L'adéfovir**

L'adéfovir et sa prodrogue, l'adefovir dipivoxil, sont des analogues nucléotidiques qui semblent agir sur l'activité des cellules NK et sur la réponse immune via la production d'IFN α (Calio *et al.*, 1994). L'adéfovir est efficace à la fois sur les souches « sauvages » et mutantes précocore, mais aussi sur des mutants de résistance à la lamivudine (Perrillo *et al.*, 2000). Il permet de diminuer efficacement la charge virale et de normaliser les transaminases, aussi bien chez les patients AgHBe+ que chez les patients AgHBe- (Hadziyannis *et al.*, 2003; Marcellin *et al.*, 2003). Toutefois, comme pour la lamivudine, la séroconversion HBe est tardive chez les patients AgHBe+.

➤ **Les nouvelles approches thérapeutiques du VHB**

Le ténofovir, inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH, apparaît comme un traitement de choix des coinfections VIH/VHB. Il a la même activité sur le contrôle de la multiplication virale que l'adéfovir: il est actif sur toutes souches de VHB, y compris les mutants d'échappement à la lamivudine (Zoulim, 2002).

L'entécavir présente une puissante activité inhibitrice sur l'ADN superenroulé intra-hépatique.

De nombreuses autres molécules, telles l'emtricitabine, la clévodine, les β L-nucléosides (telbivudine et val-LdC) (Asselah *et al.*, 2005) constituent des voies alternatives du traitement du VHB.

I.11. Prévention des infections à VHB

Les mesures préventives de l'infection à VHB font recours à une immunisation active à travers la vaccination et une immunisation passive (immunothérapie passive) à travers l'utilisation des immunoglobulines. Elles incluent également les mesures générales d'hygiène et l'ensemble des règles utilisées pour réduire les infections sexuellement transmissibles (IST). Elles concernent également la promotion de l'utilisation de matériels médicaux à usage unique et la réduction des risques résiduels dans les banques de sang ou d'organes en excluant tout donneur AgHBs positif et AchBc positif.

II. LE VIRUS DE L'HEPATITE DELTA (VHD)

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 nouvel agent infectieux distinct du VHB. Il a été appelé agent Delta puis virus de l'hépatite Delta ou VHD.

II.1. Caractéristiques du virus

II.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.

II.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 nucléotides) complémentaire de l'ARN génomique. Trois formes différentes d'ARN sont observées au cours du processus de réplication du HDV : le génome, l'antigénome et l'ARN messenger (mRNA) (**Figure 14**). L'antigénome est le total

complémentaire du génome et l'ARN messager servira de matrice à la synthèse de l'antigène delta.

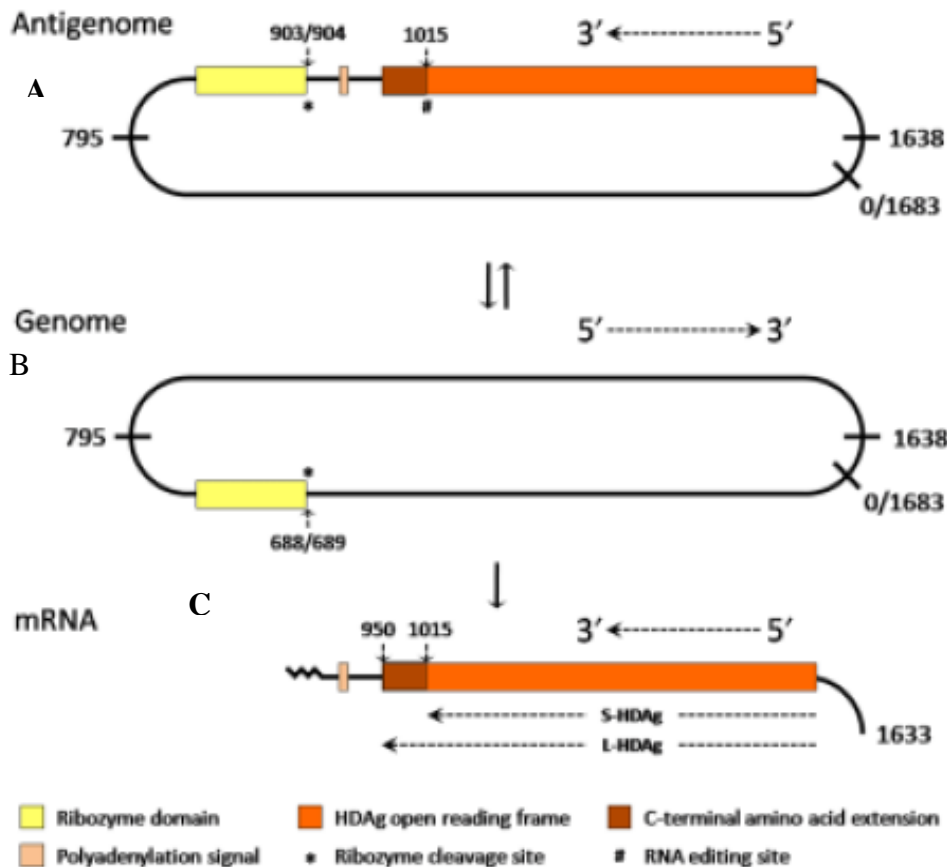


Figure 14 : Les différentes formes du génome du VHD.

A : Antigenome, B : Génome et C : ARN messager (Jaw-Ching Wu, 1999)

II.1.3. Variabilité génétique du virus de l'hépatite D

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

génomique 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).

Récemment, l'analyse phylogénétique a permis de classer les souches virales de VHD identifiées dans le monde en huit génotypes ou clades. En dehors du génotype 1 qui est ubiquitaire, les autres génotypes présentent une distribution géographique assez distincte. En effet, le VHD-2 est retrouvé au Japon, en Taiwan et en Russie ; le VHD-4 au Japon et en Taiwan ; le VHD-3 dans le bassin amazonien et les génotypes VHD-5, VHD- 6, VHD- 7 et VHD- 8 ont une origine africaine (Le Gal *et al.*, 2006). On note une divergence de plus de 16% au sein du même génotype et 20 à 40% de divergence entre les génotypes différents.

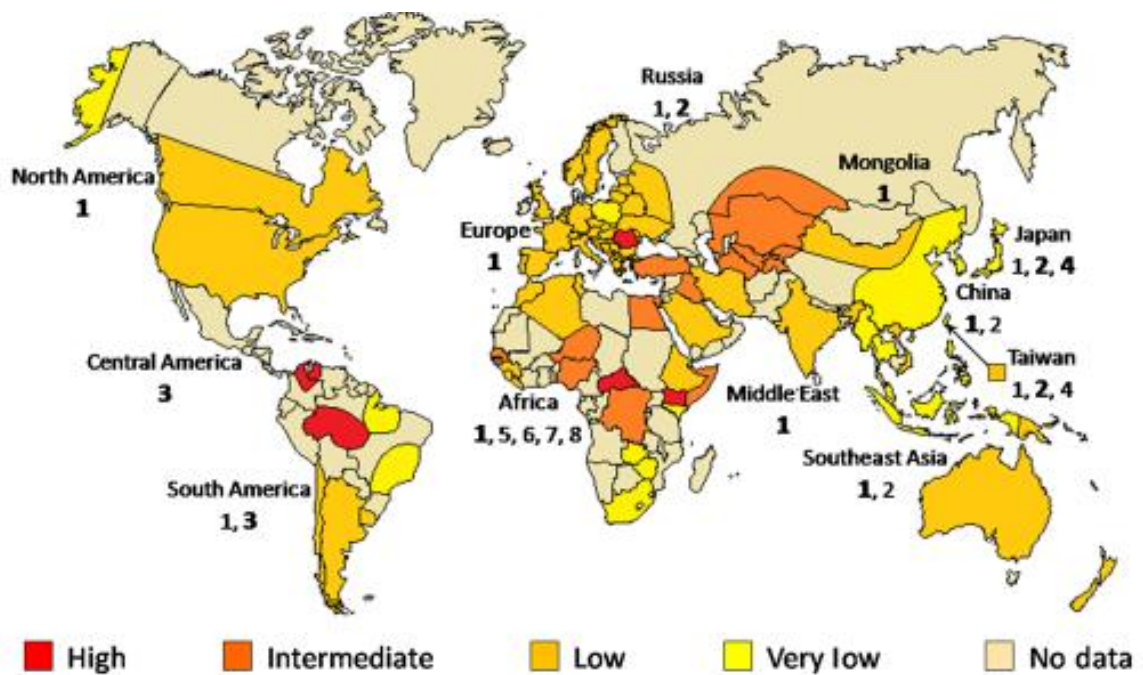


Figure 15 : Séroprévalence de l'infection à VHD et des génotypes prédominants dans le monde. Adapté (Shih *et al.*, 2010).

II.1.5. Les 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.

II.1.6. La Multiplication du VHD

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 et à la marmotte. 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.

Le cycle de multiplication du VHD peut être résumé schématiquement en trois étapes : i) la fixation aux récepteurs, l'internalisation et les étapes précoces de la réplication, ii) la synthèse des protéines virales et iii) l'assemblage et la sortie des particules infectieuses.

➤ La fixation aux récepteurs, l'internalisation et les étapes précoces de la réplication

Le virion reconnaît et s'attache à l'hépatocyte à travers le récepteur cellulaire encore non identifié à ce jour. La fusion entre l'enveloppe virale et la paroi cellulaire permet la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire. La nucléocapside migre vers le noyau grâce à des signaux de localisation nucléaire portés par l'antigène delta (Xia *et al.*, 1992). Le virus va utiliser

les ARN polymérasés de la cellule hôte. Trois formes d'ARN seront ainsi produites durant la réplication : l'ARN génomique circulaire, ARN antigénomique et l'ARN messager (**Figure 16**).

➤ Synthèse des protéines virales

Dans le cytoplasme, l'ARNm sert de matrice pour la synthèse de l'antigène delta qui se présente sous formes : Large-HDAg et small-HDAg. Small-HDAg retourne dans le noyau et assure la réplication virale (Taylor, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2001). Tandis que L-HDAg assure la régulation négative de la réplication du VHD. Le processus d'édition de l'ARN est capital pour la réplication virale car il contrôle le niveau de formation de chaque isoforme protéique et assure par là même l'équilibre entre la synthèse virale et l'assemblage des particules virales.

➤ Assemblage et sortie des particules

Le processus de modifications post traductionnelle de la L-HDAg tel la prenylation du résidu de cystéine du côté C terminal lui confère l'habilité à se fixer sur l'HBsAg et assurer l'assemblage de la particule virale (Glenn *et al.*, 1990). La phosphorylation de la sérine à la position 177 de S-HDAg accroît la réplication de l'ARN antigénomique par interaction avec l'ARN polymérase II (Chen *et al.*, 2008; Hong & Chen, 2010), tandis que sa sumoylation accroît la synthèse de l'ARN génomique et de l'ARNm (Tseng *et al.*, 2010). La méthylation du S-HDAg par l'arginine méthyltransférase sur l'arginine-13 assure sa translocation au niveau du noyau et la réplication du brin d'ARN antigénomique pour former le brin d'ARN génomique (Li *et al.*, 2004). Dans le noyau, les molécules L-HDAg et celles de S-HDAg forment des complexes qui sont exportés au niveau de la membrane de Golgi grâce aux signaux C terminaux du L-HDAg. Au niveau de l'appareil de Golgi, ces complexes s'associent avec les protéines d'enveloppe du VHB pour créer des particules infectieuses (Barrera *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991).

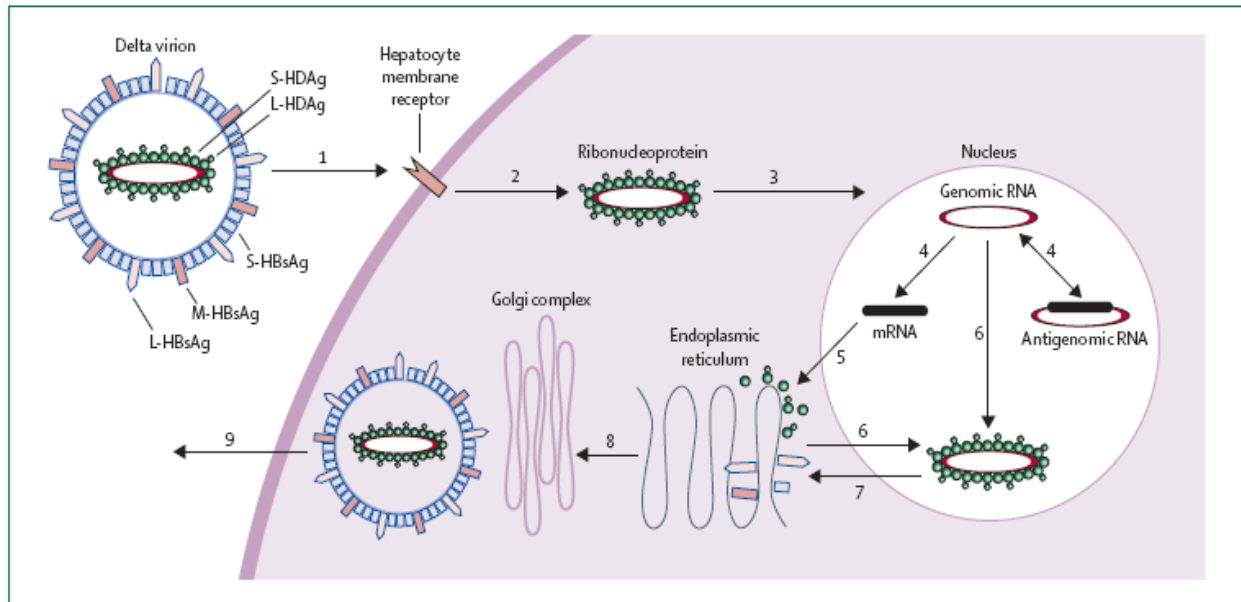


Figure 16 : Schéma de la particule delta et de son cycle de répllication. (Andrade *et al.*, 1992)

Attachement du virion à la surface des hépatocytes ; (2) entrée de la nucléocapside virale dans l'hépatocyte, (3) transfert de l'ARN virale dans le noyau ; (4) transcription de l'ARN génomique en ARN antigénomique et ARNm, (5) ARNm est exporté dans le cytoplasme pour la synthèse des protéines virales ;(6) les protéines virales synthétisées retournent dans le noyau cellulaire pour former nucléocapside virale ; (7) sortie de la nucléocapside virale dans le cytoplasme ; (8) enveloppement de la nucléocapside virale à travers des liaisons entre l'antigène de surface du virus de l'hépatite B et les protéines delta ; (9) Sortie des particules virales de l'hépatocyte pour infection des nouvelles cellules.

II.2. Pouvoir pathogène du VHD

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. Le virus de l'hépatite delta induit généralement des formes d'hépatites sévères. Cependant, on observe une grande variation dans l'évolution clinique des patients. Certaines formes sont asymptomatiques et d'autres fulminantes.

La forme aiguë apparaît après un temps d'incubation compris entre 3 et 7 semaines. La phase pré ictérique est caractérisée par des symptômes non spécifiques tels que la fatigue, la léthargie, l'anorexie, la nausée et une apparition des marqueurs biochimiques comme l'élévation des transaminases sériques (ASAT et ALAT). La phase ictérique, parfois absente est caractérisée par une élévation de la bilirubine sérique.

La forme fulminante intervient spécialement dans le cas de surinfection delta. Elle est plus fréquente dans les superinfections que dans les mono infections B et se caractérise par une nécrose massive des hépatocytes conduisant à un échec de la fonction hépatique et la mort du patient dans 80% des cas. La vie du patient peut être sauvée à travers d'une transplantation du foie en urgence.

Les formes chroniques de l'infection par le VHD sont souvent plus sévères que les autres formes d'hépatites virales chroniques. Elles peuvent être asymptomatiques ou présenter des symptômes non spécifiques. Le diagnostic est souvent fortuit ou très tard au stade de cirrhose. Le risque de développer la cirrhose chez les porteurs chroniques VHD est deux fois plus élevé comparé aux patients mono infectés VHB. En effet, 70-80% des porteurs chroniques développent la cirrhose entre 5-10 ans et 15% développent la cirrhose dans 1-2 ans. La cirrhose due au VHD reste stable quelque année avant de progresser au stade de cirrhose décompensée ou carcinome hépatocellulaire. Parmi les porteurs HDV et cirrhose associée, 49% ont une probabilité de vivre 5 ans et 40% pourront vivre 10 ans.

Plusieurs facteurs peuvent influencer le cours de l'évolution clinique de l'hépatite chronique delta. Le facteur majeur est le mode de l'infection D (co-infection vs super infection). Le génotype est un facteur de sévérité du VHD.

II.3. 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, reflète 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. 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.

II.4. 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.

II.5. Virus de l'hépatite D et carcinome hépatocellulaire

L'infection par le VHD entraîne des cirrhoses et s'associe à un développement précoce du cancer de foie. 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 (Bueno *et al.*, 1994).

II.6. Epidémiologie de l'infection par le virus de l'hépatite D

On estime globalement à 5% la proportion de porteurs d'AgHBs infectée par le VHD dans le monde. Cependant, des disparités de prévalence géographique existent.

Dans les pays occidentaux (Europe du 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 intra veineux). 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.

II.6.1. Infection par le VHD au Cameroun

II.6.1.1.. Séroprévalence du VHD au Cameroun

Quatre études ont rapportées la séroprévalence du VHD au Cameroun. Cette séroprévalence varie de 1 à 46% selon les populations étudiées (**Tableau III**).

Tableau III : Séroprévalence du VHD au Cameroun.

Référence	Population étudiée (Région)	Nombres sujets	% Ac anti D
(Garrigue <i>et al.</i> , 1985)	Population générale (Nord)	100	1
(Poveda <i>et al.</i> , 1986)	Population générale (15-44 ans) (Nkongsamba)	30	6.5
(Ndumbe, 1991)	Femmes enceintes, prostituées, patients ictériques, drépanocytaires polytransfusés et étudiants en médecine	110	27.3
(Ndumbe <i>et al.</i> , 1993)	Pygmées Baka de l'Est (15-45 ans)		46%

Ac anti D : anticorps dirigés contre la protéine D du VHD

II.6.1.2. Diversité génétique du virus de l'hépatite delta au Cameroun

Il n'existe pas d'étude sur la diversité génétique de l'infection à VHD au Cameroun. Mais, toutefois les souches du VHD ont été identifiées chez des patients d'origine Camerounaise résident en France (Le Gal *et al.*, 2006).

II.7. Le diagnostic virologique de l'infection par le virus de l'hépatite D

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.

II.7.1. Le 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 les techniques ELISA.

- 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.

II.7.2. 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.

II.8. Traitement et prévention de l'hépatite delta

A l'heure actuelle, aucun traitement n'est recommandé pour 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; Madejon *et al.*, 1994).

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.

Plusieurs approches pouvant conduire la production d'un vaccin pour protéger les porteurs du VHB de la super infection delta ont été expérimenté sans succès chez la marmotte d'Amérique. Le vaccin contre le VHB protège aussi contre le VHD.

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES

II. POPULATIONS ETUDIEES

II.1. Population humaine

La population humaine était constituée des porteurs chroniques VHB et des pygmées.

II.1.1. Les porteurs chroniques VHB

Les populations des porteurs chroniques VHB étudiées sont celles qui ont été référées au Centre Pasteur du Cameroun (CPC) par leurs médecins traitants pour les examens complémentaires dans le cadre du suivi thérapeutique de leur infection par le VHB. Ces examens complémentaires comprenaient les marqueurs sérologiques du VHB tels que l'antigène d'enveloppe et les anticorps dirigés contre cet antigène, les anticorps dirigés contre la protéine delta du VHD. Ce bilan comprenait aussi la quantification de l'ADN du VHB (charge virale).

Au total, 233 personnes porteuses d'AgHBs ont été référées de façon consécutive entre Mai 2008 et Mai 2009. Durant la consultation médicale, une demande de participation à l'étude sur la diversité génétique des VHB et VHD et l'étude des mutations associées à l'évolution des VHB et VHD leur a été proposée par leurs médecins traitants.

II.1.2. Les pygmées

Les populations pygmées étudiées appartenaient aux trois groupes ethniques pygmées du Cameroun : Baka des régions de l'Est et du Sud Cameroun, Bakola de la région du Sud Cameroun et Bedzam de la Région du Centre Cameroun (**Figure 17**). Cette étude a été menée dans le cadre de la surveillance des maladies virales émergentes dans la population pygmée du Cameroun conduite entre 2005 et 2008 (Calattini *et al.*, 2011). Pendant cette période, 564 échantillons ont été collectés dont 364 chez les pygmées Baka, 101 chez les Bakola et 59 chez les Bedzam.

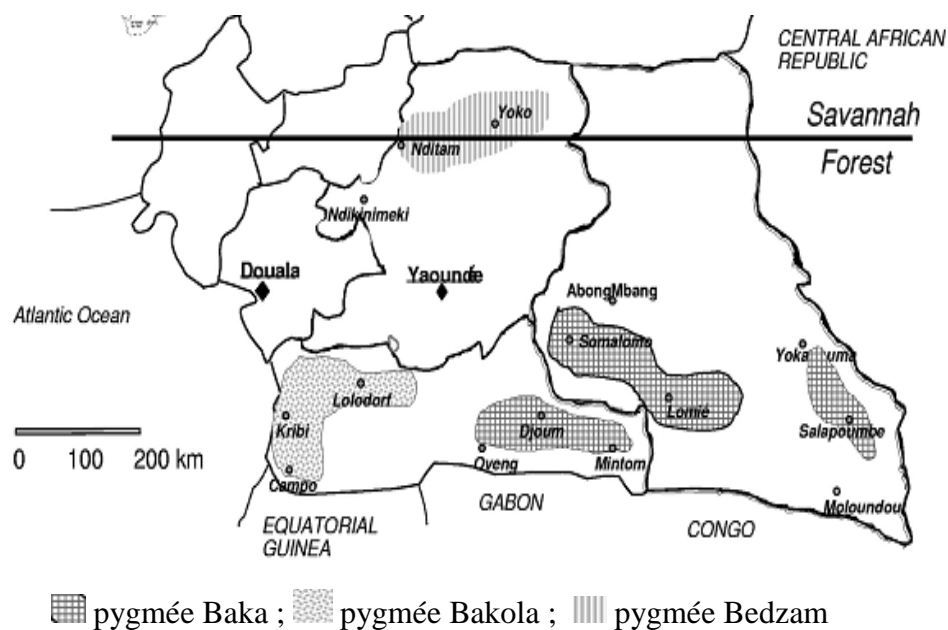


Figure 17: Localisations géographiques de trois grands groupes ethniques pygmées du Cameroun (Foupouapouognigni *et al.*, 2011)

II.2. Populations des primates non humains (PNH)

Elles comprenaient les grands singes (chimpanzés et gorilles) et les petits singes de la famille des *cercopithecidae*. Ces animaux étaient en captivité dans les centres zoologiques de Limbé, de la Mefou, de Yaoundé et de Belabo au Cameroun. Ces jeunes animaux étaient arrivés dans ces centres d'accueil soit après confiscation chez les chasseurs ou des tenants locaux, soit après être devenus orphelins victimes de la chasse et du trafic illicite de la viande de brousse. Dès leur arrivée dans ces centres zoologiques, ces PNH étaient prélevés et les échantillons étaient acheminés au CPC pour la réalisation des analyses biologiques. Pendant ce temps, l'animal était mis en quarantaine pour observation avant de rejoindre les autres animaux de la même espèce au regard des résultats des analyses biologiques.

II.3. Considérations éthiques

Pour les populations humaines

La Clairance Ethique et l'autorisation administrative pour la réalisation de cette étude ont été obtenues. Les participants avaient bénéficié d'une consultation médicale gratuite et toute personne présentant une pathologie avait bénéficié d'une prise en charge.

Pour toutes ces deux populations humaines, les consentements éclairés ont été obtenus chez tous les participants. Pour des personnes mineures, les approbations de participation ont été obtenues des parents ou des tuteurs de ces dernières.

Pour les PNH

Une convention a été signée entre le CPC et le Ministère de la Faune et de la Forêt stipulant que le CPC assurerait le diagnostic et le suivi biologique de ces animaux mis en quarantaine et que la constitution de la biothèque pouvait servir pour la recherche. Cette convention a été enregistrée sous le numéro 435/1996.

II.4 Matériel biologique

II.4.1. Type de matériel biologique utilisé

Le matériel biologique utilisé dans cette étude était du sang total.

i) Pour les 233 porteurs chroniques de VHB et 524 pygmées : des prélèvements de sang ont été obtenus dans le cadre de la surveillance des maladies à transmission parentérale dans ces populations,

ii) Pour les 366 échantillons de PNH : des prélèvements sanguins ont été obtenus chez les animaux en captivité dans les sanctuaires à primates (Vogt Betsi, Mfou, Limbé et Belabo).

Entre 1997 et 2006, un total de 366 échantillons de sang de PNH ont été acheminés au Centre Pasteur du Cameroun (CPC) pour analyse biologique. Ces échantillons ont été répartis en fonction des espèces dans le **tableau IV**. Les plasmas étaient conservés à -80°C.

Tableau IV : Répartition des échantillons des PNH en fonction des espèces.

Nom de l'espèce en français	Nom scientifique	Nombre d'échantillons
Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	159
Gorille	<i>Gorilla gorilla</i>	26
Babouin vert	<i>Papio anubis</i>	25
Mandrill	<i>Mandrillus sphinx</i>	16
Drill	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	34
Singe rouge	<i>Erythrocebus patas</i>	10
Mangabey joues grises	<i>Lophocebus albigena</i>	1
Cercocebe agile	<i>Cercocebus agilis</i>	13
Mangabey bonnet rouge	<i>Cercopithecus torquatus</i>	13
Cercopithèque tantale	<i>Cercopithecus aethiops tantalus</i>	12
Moustacs	<i>Cercopithecus cephus</i>	7
Moustacs à oreilles rousses	<i>Cercopithecus erythrotis</i>	6
Cercopithèque mona	<i>Cercopithecus mona</i>	12
Cercopithèque de Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	5
Hocheur	<i>Cercopithecus nictitans</i>	17
Cercopithèque de preuss	<i>Cercopithecus preussi</i>	1
Total		366

II.4.2 Technique de collecte et de traitement des échantillons biologiques

Le prélèvement de sang a été collecté chez les populations humaines à travers une ponction veineuse en utilisant le système vacutainer. Chez les PNH, la prise de sang a été précédée d'une étape d'endormissement de l'animal avec une anesthésie générale injectée à ce dernier à travers un pistolet. Dans les deux cas, les tubes utilisés contenaient l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) comme anticoagulant.

Les prélèvements sanguins collectés ont été acheminés au laboratoire de virologie du CPC pour centrifugation à 2500 tr/min pendant 10 minutes. Le plasma obtenu a été reparti en plusieurs aliquotes dans des tubes eppendorf de 1,5 mL et conservés à -80°C pour les analyses ultérieures. Les cellules blanches étaient aussi conditionnées dans les tubes pour conservation à -80°C.

II.5 Techniques de diagnostic sérologique des infections par le VHB et le VHD

Toutes les analyses sérologiques ont été conduites avec des trousse commerciales. La réalisation de ces analyses a été conduite en respectant de façon stricte les recommandations des fabricants et les règles de bonne pratique de laboratoire.

II.5.1. Techniques de diagnostic sérologique de l'infection par le VHB

Dans notre étude, le diagnostic de l'infection par le VHB a été réalisé en utilisant le kit MONOLISA® Ag HBS PLUS (Biorad, Marnes la Coquette, France). Cette trousse contenait les cupules recouvertes d'anticorps monoclonaux et polyclonaux, la solution de lavage concentrée, les contrôles positif et négatif, le conjugué, le substrat et la solution d'arrêt.

➤ Principe de la détection de l'AgHBs par le test MONOLISA® Ag HBS PLUS

Le test MONOLISA® Ag HBS PLUS est une technique immunoenzymatique de type « sandwich » en une étape dont le complexe immun (antigène-anticorps) est mis en évidence à travers un conjugué marqué par la peroxydase et révélé en présence du peroxyde d'hydrogène et du TMB (tétraméthyl benzidine). Les puits sont sensibilisés avec les anticorps monoclonaux et polyclonaux sélectionnés pour leur habilité à reconnaître les différents sous types du VHB. Le conjugué est constitué des anticorps monoclonaux et polyclonaux respectivement de souris et de mouton et couplés à la peroxydase. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité d'antigène contenue dans l'échantillon.

➤ **Méthodologie de la recherche de l'AgHBs par MONOLISA® Ag HBS PLUS**

Pour sa réalisation, 100 µl de contrôle négatif ont été distribués dans les 4 premiers puits, 100 µl de contrôle positif dans le puits suivant et 100 µl de plasma de chaque échantillon en fonction du plan de la plaque. Un volume de 50 µl de conjugué reconstitué a été ensuite ajouté dans tous les puits. La plaque recouverte à l'aide d'un film autocollant a été incubée à 40°C pendant une heure. A la fin de l'incubation, la plaque a été lavée 5 fois avec la solution de lavage (tampon tris NaCl à pH 7,4) et à l'aide du laveur automatique. La plaque a été séchée avec du papier absorbant. La révélation a été effectuée en ajoutant 100 µl de substrat chromogène dans chaque puits et en incubant la plaque à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Après cette incubation, la réaction a été arrêtée par ajout de 100 µl de solution H₂SO₄ 1 N et la lecture des densités optiques (DO) immédiatement après l'arrêt de la réaction à la double longueur d'onde 450/620 nm.

La réaction était validée si toutes les valeurs de DO des contrôles négatifs étaient inférieures à 0,080 et si la valeur de la DO du contrôle positif était supérieure ou égale à 1,000. La valeur seuil (VS) a été calculée en ajoutant 0,050 à la moyenne des DO des contrôles négatifs. Le ratio de chaque échantillon était calculé en divisant la DO dudit échantillon par VS. Les échantillons ayant un ratio en dessous de 1 ont été considérés non réactifs et ceux de ratio supérieur à 1 considérés comme réactifs. Les échantillons de ratio compris entre 0,9 et 1 ont été retestés.

II.5.2. Techniques de diagnostic sérologique de l'infection par le VHD

Le diagnostic sérologique de l'infection par le VHD a été réalisé par la détection de l'anticorps dirigé contre l'antigène delta (AcVHD) grâce au kit Murex anti-Delta (total). Chaque coffret contenait : un flacon de diluant pour échantillon, les barrettes constituées des cupules recouvertes d'antigène delta, les contrôles négatif et positif, le conjugué, le substrat et son diluant.

➤ **Principe de la recherche des anticorps anti delta par le test Murex anti-Delta (total)**

Le Murex anti-Delta (total) est une technique immuno-enzymatique (EIA) de type compétition. Les cupules sont recouvertes de l'antigène delta (AgHD). Le complexe immun (Ag-Ac) est révélé à travers un conjugué constitué d'anticorps humains anti-HD couplés à la peroxydase de raifort suite à l'ajout du substrat qui est le 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) et de l'eau oxygénée. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti delta présent dans l'échantillon.

➤ **Procédure opératoire de la détection des anticorps anti delta par Murex anti-Delta (total)**

La réalisation de la réaction a été effectuée en distribuant 25 µL du diluant d'échantillon et 75 µL de contrôle négatif dans les deux premières cupules, du contrôle positif dans la troisième cupule et les échantillons dans les puits suivants. Après la distribution des contrôles et échantillons, la microplaque a été recouverte à l'aide d'un film adhésif et incubée à 37°C pendant une heure. A la fin de cette incubation, les cupules ont été lavées 5 fois avec la solution de lavage. La solution de conjugué (50 µL) a été distribuée rapidement et la microplaque a été incubée à 37°C pendant 60 min. La solution de substrat a été préparée avant la fin de l'incubation. Après l'étape de fixation du conjugué, les puits ont été lavés et séchés ; le substrat (100 µL) a été distribué rapidement dans chaque puits et les puits ont été incubé à l'abri de la lumière à 37°C pendant 30 minutes. La réaction a été arrêtée à la fin de l'incubation en ajoutant 50 µL de la solution H₂SO₄1N. L'absorbance a été lue à la longueur d'onde 450 nm contre la longueur d'onde de référence qui était de 620 nm.

La réaction a été validée si l'absorbance de chaque puits de contrôle négatif était supérieure à 0,6 et l'absorbance du contrôle positif inférieure à 0,2. La valeur seuil (VS) est obtenue en faisant la moyenne des densités optiques (DO) du contrôle négatif et en y ajoutant la valeur de la DO du contrôle positif, le tout divisé par 2 : **VS = [(DO CN1 + DO CN2) / 2 + DO CP] / 2**. Les échantillons dont la DO était inférieure à la VS ont été considérés positifs et ceux dont la DO était supérieure à la VS ont été considérés négatifs.

II.6. Techniques de diagnostic moléculaire des infections par le VHB

Il s'agit des techniques de détection, de quantification et de caractérisation génétique des VHB. Pour ce faire, les plasmas positifs en AgHBs ont suivi les étapes suivantes : Extraction de l'ADN, détection quantitative de l'ADN du VHB, détection qualitative par amplification d'une portion du génome de l'ADN du VHB, caractérisation moléculaire des VHB par séquençage et analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques des génomes partielles et/ou complètes du VHB.

II.6.1. Extraction de l'ADN du VHB

Deux techniques ont été utilisées pour l'extraction de l'ADN. Une extraction automatisée en vue de la quantification de l'ADN du VHB et une extraction manuelle pour la caractérisation génétique du VHB.

II.6.1.1. Extraction automatisée de l'ADN du VHB :

➤ Principe de l'extraction automatisée sur m24sp.

L'extraction de l'ADN sur automate m24sp utilise des microparticules magnétiques pour leur purification.

➤ Procédure opératoire de l'extraction de l'ADN sur m24sp

Elle a été réalisée sur l'automate m24sp développé par la société ABBOTT MOLECULAR. La trousse d'extraction contenait le réactif de lyse, deux tampons de lavage, le tampon d'élution, le flacon des microparticules, le contrôle négatif, le contrôle positif faible, le contrôle positif fort, les calibrateurs A et B.

Les virions sont lysés à l'aide d'un tampon de lyse dont les constituants ne sont pas indiqués et les acides nucléiques libérés sont captés par les microparticules. Une série de deux lavages sont effectués pour éliminer les particules non fixées. Les acides nucléiques liés sont

décrochés des microparticules et élués dans un champ magnétique. L'éluat ainsi obtenu est transféré dans un tube de 1,5 mL stérile sans RNase et DNase.

En pratique, l'extraction de l'ADN du VHB sur cet automate a été effectuée sur 500 µL de plasma en respectant strictement les consignes du fabricant et les règles de bonnes pratiques de laboratoire.

II.6.1.2. Extraction manuelle de l'ADN du VHB :

Elle a été réalisée en utilisant la trousse commerciale « QIAamp DNA Blood mini Kit » développé par la société QIAGEN. Cette trousse comprenait un flacon contenant le tampon de lyse, deux flacons contenant les tampons de lavage (AW1 et AW2), un tube contenant la protéinase K (PK) ; le tampon d'éluion et les colonnes « QIAamp spin column ».

➤ Principe de l'extraction de l'ADN par le « QIAamp DNA Blood mini Kit »

L'extraction de l'ADN par ce kit est basée sur l'adsorption sélective et réversible de l'ADN sur une membrane à base de silice. Les particules virales sont d'abord lysées à l'aide du tampon de lyse et sont précipitées avec l'éthanol absolu. Le lysat viral précipité est déposé sur la colonne qui s'y fixe et les contaminants sont efficacement lavés à travers deux séries de lavage et centrifugation à l'aide des tampons AW1 et AW2. L'ADN de haute pureté est élué avec le tampon d'éluion (AVE).

➤ Procédure opératoire de l'extraction de l'ADN avec le « QIAamp DNA Blood mini Kit »

Un mélange de 200 µL de plasma et 560 µL de tampon de lyse supplémenté avec la protéinase K (favorise la rupture des membranes cellulaires) est homogénéisé à l'aide d'un vortex et incubé à 56°C pendant 10 min. L'ajout de 560 µL d'éthanol absolu permet la précipitation des ADN. L'adsorption de l'ADN sur la colonne est réalisée à travers deux passages de 630 µL du lysat sur la colonne, suivie d'une centrifugation à 6000g pendant une minute. Après l'adsorption de l'ADN, la colonne est d'abord lavée par dépôt sur la colonne de

500µL du tampon AW1 et centrifugation à 6000xg pendant 1 min ; puis par dépôt sur la colonne de 500µL du tampon AW2 et centrifugation à 20000xg pendant 3 min. les colonnes sont enfin transférées sur des tubes collecteurs de déchets pour une centrifugation à 20000xg pendant 1 min dans le but d'éliminer toute trace d'éthanol qui pourrait inhiber la réaction PCR. Les colonnes sont transférées sur les tubes eppendorf de 1,5 mL et l'ADN est élué en mettant 200 µL sur la colonne, incubation à température ambiante pendant 2 à 3 minutes et centrifugation à 6000xg pendant 1 minute. Les éluats d'ADN ainsi obtenus sont étiquetés et conservés à – 80° C pour les analyses ultérieures.

II.6.2. Détection quantitative de l'ADN plasmatique du VHB

La détection quantitative de l'ADN plasmatique du VHB (ou Charge virale plasmatique du VHB) a été réalisée en utilisant le kit « Abbott RealTime HBV » développé par la société ABBOTT MOLECULAR. Ce kit contenait un flacon d'enzyme Amplitaq Gold, un flacon d'oligonucléotides (4 amorces, 2 sondes, dNTPs et le fluorochrome de référence) ; un flacon de réactif d'activation (chlorure de magnésium). La séquence ciblée VHB est située sur le gène de surface du génome viral qui était une région spécifique et très conservée pour amplifier les génotypes de A à H. La séquence ciblée pour le contrôle interne (CI) est le gène de l'hydroxypyruvate réductase du plant citrouille *Cucurbita pepo* utilisé comme ADN plasmidique.

➤ Principe de la détection et quantification de l'ADN de VHB

Les gènes cibles étaient amplifiés à la suite de l'hybridation spécifique des amorces par l'enzyme Amplitaq Gold en présence de dNTPs et de magnésium. L'amplification exponentielle des cibles était atteinte en répétant ces cycles de PCR. La présence des amplicons du VHB et du CI était détectée dans la même réaction au cours de l'étape d'élongation en mesurant la fluorescence de la sonde après hydrolyse du fluorochrome par la Taq. Les sondes des cibles VHB et du CI étaient marquées chacune avec un fluorophore différent, permettant ainsi une détection simultanée des produits amplifiés à chaque cycle. Le cycle d'amplification pour lequel

le signal est détecté par la caméra du l'appareil Abbott m2000rt était inversement proportionnel au logarithme de la concentration en ADN du VHB présente dans l'échantillon de départ.

➤ **Procédure opératoire de la détection et quantification de l'ADN**

La détection et la quantification de l'ADN du VHB commençait par la distribution de 25 µl du mélange réactionnel prêt à l'emploi dans chaque puits identifié de la microplaque devant servir pour l'amplification. Un volume de 75 µl d'extrait d'ADN a été ajouté dans les puits respectifs. La microplaque a été scellée avec un film adhésif et incubée dans le thermocycleur (m2000rt) pour amplification. Les paramètres d'amplification ont été préalablement programmés par le fabricant.

La réaction a été validée si et seulement si : i) le contrôle négatif était indétectable, ii) les contrôles positifs et interne étaient détectés et quantifiés dans la fourchette recommandée. Le contrôle de qualité était assuré par le logiciel du m2000rt. Une fois la réaction validée, le nombre UI/ml de plasma a été exprimé pour chaque échantillon suivi de son expression en logarithme base 10. La limite de détection était de $< 1,00 \log \text{ UI/ml}$ et celle de la limite supérieure de $> 9,00 \log \text{ UI/ml}$

II.6.3. Détection qualitative de l'ADN du VHB

La détection qualitative de l'ADN du VHB a été réalisée en utilisant les techniques de polymérisation en chaîne ou « Polymerase Chain Reaction » en abrégé PCR.

➤ **Principe de l'amplification par PCR**

La PCR est une technique d'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues par un procédé d'extension d'amorces. Elle consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse de 16 à 25 nucléotides complémentaires des régions 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Sous l'action d'une enzyme (l'ADN polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'-3' d'une séquence exactement complémentaire du brin matrice. Chaque cycle PCR se déroule en 3 étapes : la dénaturation de

l'ADN, l'hybridation des amorces et l'élongation. A la fin du cycle, on obtient deux brins d'ADN correspondant à la séquence comprise entre les deux amorces. La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée. Ce cycle est répété 20 à 40 fois pour une amplification exponentielle de la séquence cible.

Pour accroître la sensibilité et la spécificité des réactions de PCR, d'autres variantes de PCR dites PCR nichée ou semi-nichée ont été utilisées. La PCR nichée consiste à réaliser sur les amplicons de la première PCR une deuxième PCR en utilisant un nouveau couple d'amorces internes aux amplicons. La PCR semi nichée utilise une nouvelle amorce interne tout en gardant l'une des amorces de la première PCR.

➤ **Procédure opératoire de détection d'ADN VHB par PCR (Hubschen *et al.*, 2011)**

Les noms, séquences nucléotidiques, régions et position sur le génome du VHB et température d'hybridation des amorces utilisées pour amplification des différents gènes du VHB sont présentés dans le **Tableau V**.

Les régions du génome du VHB amplifiées, les noms des amorces utilisées, la composition des milieux réactionnels et les programmes utilisés pour l'amplification des isolats du VHB au sein de chaque population étudiée sont présentés dans le **Tableau VI**.

Les différents fragments subgénomiques amplifiés pour l'obtention du génome complet du VHB chez les populations humaines et des petits singes, et les grands singes sont présentées dans les **Tableaux VII et VIII**, respectivement.

Tableau V : Noms, séquences nucléotidiques, régions et positions sur le génome du VHB et température d'hybridation des amorces utilisées pour amplification des différents gènes du VHB. (Khelifa & Thibault, 2009; Olinger *et al.*, 2006; Starkman *et al.*, 2003)

Nom	Séquence 5'-3'	Région Gènes	Position	Tm (°C)
HBVS1	CATCAGGAYTCCTAGGACCCCT	S et P	171-192	55
HBV24	AGTAAAYTGAGCCARGAGAAAGGG	S et P	684-661	56
HBVS3	CGTGTTACAGGCGGKGTCTTCTTGT	S et P	196-221	61
HBV23	ACGGRCTRAGGCCCACTCCCATAG	S et P	664-641	60
HBV41	CGTCGCMGAAGATCCAATCT	C, Pré S1/S2, S et P	2423-2443	61
HBV16	CCCCTRGAAAAYTGAGAGAAGTC	C, Pré S1/S2, S et P	287-265	53
HBV42	GTATYCCCTGGACTCATAAGG	C, Pré S1/S2, S et P	2461-2481	45
HBV15	GTCCACCACGAGTCTAGAYTCTK	C, Pré S1/S2, S et P	267-245	51
HBV2	ACTGTTCAAGCCTCCAAGCT	C et P	1862-1881	60
HBV40	GTTTGGAARTAATGATTAAC	C et P	2746-2726	51
HBV4	GAGCTWCTGTGGAGTTACTCTC	C et P	1932-1953	47
HBV39	CTGGATAATAAGGTTTAAT	C et P	2718-2700	48
HBV28	TCGCCAACTTAYAAGGCCTTT	P, X, Pré-C et C	1102-1122	53
HBV3	AGTGCGAATCCACACTC	P, X, Pré	2287-2271	52
HBV29	CCTTTACCCCGTTGCYCGGCA	P, X, Pré	1153-1173	63
HBV34	CAATGYTCNGGAGACTCTAA	P, X, Pré	2046-2027	58
HBV11	AAWTGCACWTGTATTCCCATCCC	S et P	592-615	56
HBVPS44	GCYCCAGACCKGCTGCGAGCRAAA	S et P	1317-1293	63
HBV25	TGGTATTGGGGGCCAARTCTG	S et P	752-772	58
HBVPS45	AGGAGTTCCGCNGTATGGATCGG	S et P	1284-1261	60
Pol1m	CCCTGCTCGTGTTACAGGCGG	P	186-206	67
Pol2m	GTTGCGTCAGCAAACACTTGGCA	P	2010-2025	66
Pol3m	GACTCGTGGTGGACTTCTCTCA	P	250-272	63
Pol4m	GGCATTAAAGCAGGATAACCACATTG	P	161-176	62
Fw 2422	AGAACTCCCTGCCCTCGCAGAC	Pré S	2375-2396	67
Pres-R	ACAGGCGGKGTCTTCTTGTGA	Pré S	199-222	65
Fw 2451	TCAATCGCCGCGTCGCAGAA	Pré S	2404-2423	63
P2F	CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	S	56-75	62
979	ATTGGAAAGTATGTCAAAGAATTGGTCTTTTG	S	977-1001	62
Mc2r	TGGAAGTTGGGGATCATTGCC	S	892-911	62
Fw-1608	GCATGGAGACCACCGTGAACG	C	1606-1626	65
Rv-2661	CAATTTGTAGGTCTCTAACAGTAAATGAA	C	2586-2615	60
Fw1644	TGCCCAAGGTCTTACATAATAGGACTCTTG	C	1639-1668	64
Fw-455	CAAGGTATGTTGCCCGTTT	X	455-473	58
Rv-1800	TAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT	X	1771-1800	64
Fw-696	TCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC	X	694-715	63

Les lettres S, PréS, P, PréC, C et X indiquent respectivement les gènes du VHB

Tableau VI : Régions des génomes du VHB amplifiées, noms des amorces utilisées, composition du mélange réactionnel et programmes d'amplification utilisés amplification des isolats du VHB au sein de chaque population étudiée.

(Khelifa & Thibault, 2009; Olinger *et al.*, 2006; Starkman *et al.*, 2003)

Population étudiée	Régions amplifiées	Couple d'amorces PCR, milieu réactionnel (volume, Composition), conditions d'amplification	Couple d'amorces nested /sémi nested, milieu réactionnel (volume, Composition), conditions d'amplification	Référence
porteurs chroniques de VHB	Polymerase	Pol1m/Pol2m 50 µl (Tampon 10X : 1X, MgCl ₂ : 1.5mM, dNTPs : 200nM, 0.40µM de chaque amorce, 0.05 U/µl de Taq, 5µl de matrice et eau). 94°C/5 min, puis 39 cycles (94 °C/45 s ; 55 °C/45s ; 72 °C/30s), elongation finale 72°C/5min et conservation à 4°C	Pol3m/Pol4m 50 µl (Tampon 10X : 1X, MgCl ₂ : 1.5mM, dNTPs : 200nM, chaque amorce : 0.20µM, Taq polymérase : 0.04 U/µl, matrice : 1µl et eau). 94°C/5 min, puis 30 cycles (94 °C/45 s ; 55 °C/45s ; 72 °C/30s) elongation finale 72°C/5min et conservation à 4°C	(Khelifa & Thibault, 2009)
pygmées et grands singes	Gène S	HBVS1/HBV24 50 µl (Tampon 10X : 1X, MgCl ₂ : 1.5mM, dNTPs : 200nM, 0.20µM de chaque amorce, 0.04 U/µl de Taq, 5µl de matrice et eau). 94°C/2 min, puis 30 cycles (94 °C/30 s ; 55 °C/21s ; 72 °C/90s) et elongation finale 72°C/5min et conservation à 4°C	HBVS3/HBV23 50 µl (Tampon 10X : 1X, MgCl ₂ : 1.5mM, dNTPs : 200nM, 0.20µM de chaque amorce, 0.04 U/µl de Taq, 1µl de matrice et eau). 94°C/2 min, puis 30 cycles (94 °C/30 s ; 55 °C/21s ; 72 °C/90s) et elongation finale 72°C/5min et conservation à 4°C	(Starkman <i>et al.</i> , 2003)
Petits singes	Gène S	<u>P2f/979</u> 50 µl (Tampon 10X : 1X, MgCl ₂ : 1.65mM, dNTPs : 200nM, 0.20µM de chaque amorce, 0.04 U/µL de Taq, 5µL de matrice et eau). 94°C/5 min, puis 39 cycles (94 °C/45 s ; 55 °C/45s ; 72 °C/30s) et elongation finale 72°C/5min et conservation à 4°C	<u>P2f/Mc2r</u> 50 µL (Tampon 10X : 1X, MgCl ₂ : 1.5mM, dNTPs : 200nM, 0.20µM de chaque amorce, 0.04 U/µL de Taq, 1µL de matrice et eau). 94°C/5 min, puis 30 cycles (94 °C/45 s ; 55 °C/45s ; 72 °C/30s) et elongation finale 72°C/5min et conservation à 4°C	(Olinger <i>et al.</i> , 2006)

Tableau VII : Stratégie d'amplification des fragments subgénomiques pour l'obtention du génome complet des VHB des populations humaines et des petits singes. (Starkman *et al.*, 2003)

	Désignation	Fragment preS	Fragment S	Fragment X	Fragment C
PCR 1	Amorce sens	FW2422	P2F	455	fw1608X
	Amorce antisens	Prés-R	979	1800	rv2661
	Concentration amorce (nM)	200	200	200	200
	MgCl ₂ (mM)	1,65	1,65	1,5	2
	Taq Polymérase (U/μl)	0.04	0.04	0.04	0.04
	Matrice (μl ADN extrait)	5	5	5	5
	Volume finale (μl)	50	50	50	50
	Programme d'amplification	95°C pdt 20 s, puis (95°C pdt 20 s, puis 63°C pdt 20 s et 72°C pdt 60 s en 40 cycles)	95°C pdt 20 s, puis (95°C pdt 20 s, puis 63°C pdt 20 s et 72°C pdt 60 s en 40 cycles)	95°C pdt 20 s, puis (95°C pdt 20 s, puis 62°C pdt 20 s et 72°C pdt 60 s en 40 cycles)	95°C pdt 20 s, puis (95°C pdt 20 s, puis 60°C pdt 20 s et 72°C pdt 60 s en 40 cycles)
PCR 2	Amorce sens	fw2451	P2F	fw696	fw1644Xmm
	Amorce antisens	preS-R	Mc2r	1800	rv2661
	Concentration amorce (nM)	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM
	MgCl ₂ (mM)	1.5	1.5	1.5	2.0
	Taq Polymérase (U/μl)	0.04	0.04	0.04	0.04
	Matrice (μL de la PCR 1)	1	1	1	1
	Volume finale (μl)	50	50	50	50
	Programme d'amplification	95°C pdt 20 s, puis (95°C pdt 20 s, puis 65°C pdt 20 s et 72°C pdt 60 s en 30 cycles)	95°C pdt 20 s, puis (95°C pdt 20 s, puis 60°C pdt 20 s et 72°C pdt 60 s en 30 cycles)	95°C pdt 20 s, puis (95°C pdt 20 s, puis 63°C pdt 20 s et 72°C pdt 60 s en 30 cycles)	95°C pdt 20 s, puis (95°C pdt 20 s, puis 60°C pdt 20 s et 72°C pdt 60 s en 30 cycles)

Tableau VIII : Stratégie d'amplification des fragments subgénomiques pour l'obtention du génome complet des VHB des populations des grands singes.

	Désignation	Fragment. A (gène S, P)	Fragment. B (gène préS1/S2, S, P)	Fragment. C (gène C, P)	Fragment. D (gène P, S, PréC et C)	Fragment. E (gène S, P)
PCR 1	Amorce sens	HBVS1	HBV41	HBV2	HBV28	HBV11
	Amorce antisens	HBV24	HBV16	HBV40	HBV3	HBVPS44
	Concentration amorce (nM)	200	200	200	200	200
	MgCl ₂ (mM)	1,65	1,65	1,65	1,5	2
	Taq Polymérase (U/μl)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
	Matrice (μl ADN extrait)	5	5	5	5	5
	Volume finale (μl)	50	50	50	50	50
	Programme d'amplification	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 40 cycles) enfin 72°C pdt 7min	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 40 cycles) enfin 72°C pdt 7min	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 40 cycles) enfin 72°C pdt 7min	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 40 cycles) enfin 72°C pdt 7min	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 40 cycles) enfin 72°C pdt 7min
Nested PCR	Amorce sens	HBVS3	HBV42	HBV4	HBV29	HBV25
	Amorce antisens	HBV23	HBV15	HBV39	HBV34	HBVPS45
	Concentration amorce (nM)	200	200	200	200	200
	MgCl ₂ (mM)	1.5	1.5	1.5	1.5	2.0
	Taq Polymérase (U/μl)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
	Matrice (μl de la PCR 1)	1	1	1	1	1
	Volume finale (μl)	50	50	50	50	50
	Programme d'amplification	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 30 cycles) enfin 72°C pdt 7min	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 30 cycles) enfin 72°C pdt 7min	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 30 cycles) enfin 72°C pdt 7min	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 30 cycles) enfin 72°C pdt 7min	94°C pdt 5min, puis (94°C pdt 20 s, puis 58°C pdt 20 s et 72°C pdt 90 s en 30 cycles) enfin 72°C pdt 7min

II.7. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE L'INFECTION PAR LE VHD

Il s'agit ici des techniques de détection et de caractérisation génétique du VHD. Pour ce faire, les plasmas positifs aux AcVHD ont suivi les étapes suivantes : Extraction de l'acide nucléique (ARN), détection qualitative par amplification d'une portion du génome de l'ARN du VHD, caractérisation moléculaire du VHD par séquençage et analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques des génomes partielles et/ou complètes.

II.7.1. Extraction de l'ARN du VHD par le « QIAamp® Viral RNA mini Kit »

Elle a été réalisée en utilisant la trousse commerciale « QIAamp® Viral RNA mini Kit» développée par la société QIAGEN. Cette trousse comprenait un flacon contenant le tampon de lyse, deux flacons contenant les tampons de lavage (AW1 et AW2), le tampon d'élution et les colonnes « QIAamp spin column ».

➤ Principe de l'extraction de l'ARN par le « QIAamp® Viral RNA mini Kit »

L'extraction de l'ARN par ce kit est basée sur l'adsorption sélective et réversible de l'ARN sur une membrane à base de silice. Les particules virales sont d'abord lysées à l'aide du tampon de lyse et sont précipitées avec l'éthanol absolu. Le lysat viral précipité est déposé sur la colonne qui s'y fixe et les contaminants sont efficacement lavés à travers deux séries de lavage et centrifugation à l'aide des tampons AW1 et AW2. L'ARN de haute pureté est élué avec le tampon d'élution (AVE).

➤ Procédure opératoire de l'extraction de l'ARN avec le « QIAamp® Viral RNA mini Kit

Un mélange de 140 µL de plasma et 560 µL de tampon de lyse a été homogénéisé à l'aide d'un vortex et incubé à température ambiante pendant 10 min. Le mélange a été ensuite précipité par ajout de 560 µL d'éthanol absolu. L'adsorption de l'ARN sur la colonne a été réalisée à travers deux passages de 630 µL du lysat sur la colonne suivi d'une centrifugation à 6000g

pendant une minute. Après l'adsorption de l'ARN, la colonne est d'abord lavée par dépôt sur la colonne de 500µL du tampon AW1 et centrifugation à 6000xg pendant 1 min ; puis par dépôt sur la colonne de 500µL du tampon AW2 et centrifugation à 20000xg pendant 3 min. Les colonnes ont été transférées sur des tubes collecteurs de déchets pour une centrifugation à 20000xg pendant 1 minute dans le but d'éliminer toute trace d'éthanol qui pourrait inhiber la réaction PCR. Enfin, les colonnes ont été transférées sur les tubes eppendorf de 1,5 mL et l'ARN a été élué en mettant 60 µl d'eau qualité biologie moléculaire sur la colonne, incubation à température ambiante pendant 2 à 3 minutes et centrifugation à 6000xg pendant 1 minute. Les éluats d'ARN ainsi obtenus ont été aliquotés en 20 µl, étiquetés et conservés à – 80° C pour les analyses.

II.7.2. Détection qualitative de l'ARN du VHD

La détection qualitative du VHD a été effectuée par PCR après une étape préalable de reverse transcription (RT) de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc).

II.7.2.1. Retro-transcription de l'ARN du VHD

Le matériel de départ étant l'ARN, il est nécessaire de le transformer en ADN avant de procéder aux réactions de PCR.

➤ Principe de la reverse transcription de l'ARN

La RT est une technique basée sur la synthèse du brin d'ADN complémentaire à la séquence de l'ARN sous l'action d'une enzyme appelée transcriptase inverse ou reverse transcriptase. Un second brin d'ADN est synthétisé après destruction enzymatique du brin d'ARN et on obtient un ADN double brin complémentaire (ADNc).

➤ Procédure opératoire de synthèse d'ADNc du VHD

Une étape de dénaturation de l'ARN du VHD a été préalablement effectuée. Un mélange constitué d'amorce aléatoire, de la matrice d'ARN et des dNTPs a été préparé et incubé à 72°C pendant 5 minutes (Tableau X)

Après l'étape de dénaturation, un volume de 7 µl du mélange de la réaction de RT a été ajouté à chaque tube de dénaturation (Tableau X)

II.7.2.2. Amplification qualitative de l'ARN du VHD

Après l'étape de RT, les séquences de VHD ont été amplifiées par PCR afin de déterminer les génotypes et sous-types circulant au sein des populations humaines, nous avons :

- i) amplifié le fragment de l'antigène delta (R0) du VHD et ii) amplifié le génome complet du VHD à travers l'amplification des fragments sub-génomiques du VHD.

Les régions amplifiées, les noms et séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification du gène de l'antigène delta (R0) et les différents fragments subgénomiques du génome complet du VHD ont été présentés dans le **Tableau IX**.

Les compositions des milieux réactionnels et les programmes d'amplification du fragment R0 et des différents fragments subgénomiques pour obtention du génome complet du VHD ont été présentés dans les **Tableaux X et XI**, respectivement.

Tableau IX : Régions amplifiées, noms et séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification du gène de l'antigène delta (R0) et les différents fragments subgénomiques des génomes complets du VHD.

Régions amplifiées	Nom de l'amorce	Séquences de l'amorce	Références
R900-480a	Fw900_2a	GACCGCGRGGAGGTGGAGATG	
	480as	CCGGGATAAGCCTCACTC	
R710-1302	710	CGCCGGCTGGGCAACAAT	(Ivanuska <i>et al.</i> , 2010)
	1302das	GGNTTCAACGACRAGGAGAG	
R320-900	320ds	CCAGAGRAMCCCTTCARCGAAC	
	Rv900	GTCCGACCTGGGCATCCG	
R0	889S	CATGCCGACCCGAAGAGGAAAG	(Radjef <i>et al.</i> , 2004)
	1289	GAAGGAAGGCCCTCGAGAACAAGA	

Tableau X : Composition du milieu réactionnel et les programmes d'amplification du fragment R0 (Radjef *et al.*, 2004)

Etape d'amplification	Désignation	Unité
Dénaturation	les amorces aléatoires	0,4 pM
	dNTP.	0,5 mM
	Matrice (ARN extrait)	5 µL
	Volume réactionnel	13 µL
	Incubation	72°C pdt 5 min
Reverse transcription (RT)	tampon 5X First-Strand	1
	dithiothreitol	0,1M
	Rnase out	(40 U/µl),
	SuperScript [®] III RT transcriptase	200 U/µl
	Volume réactionnel (ajout de 7 µL du mélange de RT à chaque tube de l'étape 1	20
	incubation	(25°C pdt 5min puis 50°C pdt 80 min et enfin 72°C pdt 15 min)
Amplification (PCR)	Amorce sens 889S	
	Amorce antisens 1289	
	Concentration amorce	0.80 µM
	dNTPs	200 µM
	Matrice (de cDNA)	5 µl
	HotStart [®] Taq DNA polymerase	0.4 µl
	Volume finale	25 µl
	Programme d'amplification	98°C pdt 30 s, puis (98°C pdt 10 s, puis 62°C pdt 30 s et 72°C pdt 60 s en 40 cycles) enfin 72°C pdt 7min et conservation à 4°C

Tableau XI : Composition du milieu réactionnel et les programmes d'amplification des fragments subgénomiques pour obtention du génome complet du VHD.(Radjef *et al.*, 2004)

Désignation	Fragment R900-480a	Fragment R710-1302	Fragment R320-900
Amorce sens	Fw900_2a	710	320ds
Amorce antisens	480as	1302das	Rv900
Concentration amorce (µM)	0.80	0.80	0.80
dNTPs (µM)	200	200	200
DMSO	0	2%	2%
Phusion Hot Start (U/µL)	0.02	0.04	0.04
Matrice (µL de cDNA)	5	5	5
Volume final (µL)	25	25	25
Programme d'amplification	98°C pdt 30 s, puis (98°C pdt 10 s, puis 62°C pdt 30 s et 72°C pdt 60 s en 40 cycles) enfin 72°C pdt 7min et conservation à 4°C	98°C pdt 30 s, puis (98°C pdt 10 s, puis 66°C pdt 30 s et 72°C pdt 60 s en 40 cycles) enfin 72°C pdt 7min et conservation à 4°C	98°C pdt 30 s, puis (98°C pdt 10 s, puis 62°C pdt 30 s et 72°C pdt 60 s en 40 cycles) enfin 72°C pdt 7min et conservation à 4°C

II.7.3. Révélation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose.

Le contrôle de l'amplification moléculaire a été réalisé en faisant migrer les produits d'amplification sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET)

➤ Principe de la révélation sur gel d'agarose à 2%

Les amplicons sont séparés en fonction de leur poids moléculaire sur un gel d'agarose. Le gel d'agarose forme un réseau complexe de pores à travers lequel les molécules d'ADN chargées négativement migrent dans un champ électrique du pôle négatif au pôle positif. L'effet « tamis » du gel d'agarose entraîne une migration différentielle des molécules en fonction de leurs tailles : les petites molécules migrent plus vite tandis que les molécules plus grandes sont freinées à travers les pores du gel. Le BET contenu dans le gel d'agarose s'intercale entre les paires de base de la double hélice d'ADN. La fluorescence du BET permet la visualisation des bandes d'ADN lorsque le gel est exposé aux rayons ultraviolets. La séparation du marqueur de poids moléculaire sur le même gel et dans les mêmes conditions permet l'estimation de la taille et de la quantité de l'amplicon obtenu. Le produit d'amplification ayant la taille du produit attendu correspond au produit d'intérêt.

➤ Procédure opératoire de la révélation sur gel d'agarose 2%

Pour la préparation de nos gels, 2 g d'agarose ont été pesés et mélangés à 100 ml de tampon TBE (Tris-borate-EDTA) 1X. Le tampon TBE a été livré à la concentration de 20X. Le tampon TBE 1X a été obtenu en faisant une dilution au vingtième du tampon commercial. Le mélange a été porté à ébullition dans un four à microonde jusqu'à l'obtention d'un mélange clair. Après refroidissement à une température d'environ 45°C, deux gouttes de bromure d'éthidium (BET) ont été ajoutées au mélange qui a ensuite été coulé dans un moule auquel ont été adaptés les peignes permettant d'obtenir les puits. Le gel solidifié a été transféré du moule au bac de migration contenant le tampon TBE 1X.

Les échantillons à migrer ont été préparés en mélangeant 10 µl de produit de PCR avec 1 µl de tampon de migration. Le marqueur de poids moléculaire a été préparé en mélangeant 1 µl

de marqueur avec 1 µl de tampon de migration et 9 µl de tampon TBE 1X. Les mélanges ont été introduits dans les puits identifiés respectivement. Le couvercle du bac de migration a été posé dessus et les deux bornes ont été connectées à un voltmètre. Les migrations ont été effectuées sous un voltage de 110V pendant 45 minutes.

Après la migration, les gels ont été transférés dans un appareil à UV auquel est incorporée une caméra. La photo du gel a été sauvegardée dans un ordinateur connecté à l'appareil de photographie pour analyse.

II.7.4 Purification des produits de PCR

En vue du séquençage, les produits de PCR obtenus ont été purifiés à l'aide des kits « QIAquick® PCR Purification » et « QIAquick® Gel Extraction » développés par la société QIAGEN. Cette étape permettait de purifier les amplicons d'intérêt en les débarrassant des fragments de faible taille, des amorces et des dNTPs. Dans les cas où plusieurs produits ont été obtenus à l'amplification, l'amplicon d'intérêt a été isolé par extraction sur gel d'agarose suivi de la purification avec le kit développé par la société QIAGEN. Dans les deux cas, le protocole utilisé a été celui recommandé par le fournisseur de ces kits.

II.7.4 1. Purification des produits de PCR par « QIAquick® PCR Purification »

Ce kit a été utilisé dans le cas où une seule bande d'intérêt a été obtenue. Il comprenait un tampon de précipitation, un tampon d'élution, le tampon de lavage et les colonnes de chromatographie.

➤ Principe de « QIAquick® PCR Purification »

Son principe est basé sur la rétention des fragments d'ADN sur les pores de la colonne de chromatographie. Après élimination des petites molécules, l'ADN est élué dans un tampon adéquat.

➤ **Procédure de purification des ADN avec le kit « QIAquick® PCR Purification »**

Un volume de 175 µl de tampon de précipitation a été ajouté à chaque produit à purifier. Le mélange a été ensuite transféré au-dessus de la colonne de chromatographie portée à une centrifugation de 12000 tr/min pendant 2 minutes. La colonne a été ensuite lavée avec 450 µl de tampon de lavage et portée à centrifugation à 12000 tr/min pendant 1 minute. L'ADN ainsi purifié a été élué avec 30 µl de tampon d'éluion.

II.7.4 2. Purification des produits de PCR par le « QIAquick® Gel Extraction»

Lorsque plusieurs bandes étaient obtenues pour un échantillon donné, la purification de l'ADN était effectuée par le kit « QIAquick® Gel Extraction». Le principe restant le même que celui utilisant le kit « QIAquick® PCR Purification ».

La portion du gel contenant la bande d'intérêt a été coupée et introduite dans un tube auquel a été ajouté le tampon de précipitation. La suite de la procédure étant identique à celle décrite dans le paragraphe ci-dessus.

II.7.5. Séquençage des produits d'amplification purifiés

Le séquençage des produits de PCR a été effectué au Laboratoire National de Santé du Luxembourg et précisément au Laboratoire d'Immunologie. Le séquençage a été effectué sur le séquenceur automatique ABI PRISM 3140 en utilisant la méthode dite de terminaison des chaînes grâce au kit « BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1» développé par la société APPLIED BIOSYSTEMS

➤ **Principe du séquençage par la méthode de SANGER**

Originellement développée par Sanger, elle repose sur la propriété de l'ADN polymérase à incorporer à la fois les nucléotides (dNTPs) et les analogues de nucléotides notamment les 2', 3'-dideoxynucléotides (ddNTPs) dans les chaînes d'ADN naissantes. Au

cours de l'amplification de séquençage, lorsqu'un ddNTP est incorporé à l'extrémité 3' de la chaîne naissante, l'élongation de cette dernière s'achève sélectivement au niveau de A, C, G ou T. Cet arrêt de l'élongation est dû au fait que les ddNTPs ne possèdent pas le groupe 3'-OH. La trousse « BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1 kit » utilise quatre marqueurs fluorescents différents pour marquer les ddNTPs. Ces ddNTPs fluorescents sont additionnés aléatoirement à toutes les positions dans les chaînes naissantes à travers une réaction de séquençage cyclique. Les produits de la réaction, marqués par les 4 fluorochromes, sont séparés par électrophorèse sur le séquenceur automatique ABI PRISM 3140 (Applied Biosystems) et la collecte des données est initiée immédiatement après le début de l'électrophorèse.

➤ **Procédure expérimentale du séquençage**

Le séquençage proprement dit comprend quatre étapes à savoir : i) amplification pour séquençage, ii) purification des produits d'amplification, iii) électrophorèse

i) Amplification pour séquençage

L'amplification pour séquençage a été effectuée en utilisant le kit « Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing » (Applied Biosystems cat# 4337456) comprenant un tampon 5X, un mélange réactionnel « Reaction mix BigDye-3.1 »

Les amorces ont été identiques à celles utilisées pour la PCR. Chaque puits a été identifié suivant le sens (sens ou antisens). Dans chaque puits identifié ont été introduits, 8 µL de réactif mix, 2 µL d'amorce sens ou antisens suivant l'identification, 10 µl de matrice pour un volume réactionnel total de 20 µl. La microplaque a été couverte à l'aide d'un film adhésif et introduite dans le thermocycleur « master wabigdyeV31 » et le programme ci-dessous a été utilisé. Les produits d'amplification ainsi obtenus ont été purifiés avant l'électrophorèse.

Tableau XII : Conditions de thermocyclage de l'amplification pour séquençage

Étapes	temperature	temps
1	96°C	3 minutes
2	Mettre la microplaque dans l'appareil	
3	96°C	1 minute
4	96°C	10 secondes
5	50°C	5 secondes
6	60°C	2 minutes
7		30 cycles
8	10°C	Hold

ii) Purification des produits d'amplification

Le but est d'éliminer les nucléotides (ddNTPs) marqués non incorporés qui pourraient créer des interférences pendant le processus électrophorétique.

Pour cela, 15 µL de la solution EDTA 42mM ont été distribués dans chaque puits de la microplaque. Ensuite 60 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à 4°C pendant 15 minutes. Puis la microplaque a été centrifugée pendant 30 minutes à 3000 tr/minute et à 4°C le contenu de la plaque a été vidé et la plaque séchée à l'aide d'un tissu. Après 70 µl d'éthanol à 70% ont été introduit dans chaque puits et la microplaque couverte avec un film adhésif a été centrifugée pendant 15 minutes à 3000 tr/min et à 4°C. Les surnageants ont été vidés immédiatement et les puits séchés à l'aide d'un tissu.

iii) Electrophorèse capillaire

Dans les puits totalement sec, 10 µl de HI DI (« Hihgly deionised formamide ») fourni par Applied Biosystem ont été introduits. La plaque a été introduite dans l'ABI 3130 et le suivi du lancement du programme de lecture. Les données ont été recueillies dans l'ordinateur connecté au système.

II.7.6. Analyses phylogénétiques des séquences obtenues

L'étude phylogénétique proprement dite comporte 4 étapes :

1. Mise en forme et alignement des séquences.
2. Application d'une méthode de génération d'arbres.
3. Évaluation statistique de la robustesse de la topologie obtenue.
4. Lecture et manipulation des arbres.

II.7.6.1 Mise en forme et alignement des séquences

Les séquences générées par le séquenceur sous format "chromatogramme" ont été systématiquement vérifiées pour corriger les erreurs de lecture. Pour les amplicons séquencés dans les deux brins, les séquences des brins sens et anti-sens ont été assemblées en « contigs » avec les séquences de référence et les séquences consensus ont été éditées et exportées sous format FASTA à partir du logiciel CLC MainWorkbench 5.5.2 (CLC bio, Aarhus, Denmark). En ce qui concerne la phase ouverte de lecture, le contrôle de qualité et le sens d'orientation des séquences consensus ont été effectués par déduction des séquences protéiques. Cette étape préalable permet la vérification des séquences des régions codantes du génome viral afin de s'assurer qu'ils ne présentent aucun codon stop, ce qui serait aberrant et signerait une erreur de séquençage. Les séquences ont été manipulées, de la correction aux alignements multiples grâce au logiciel CLC MainWorkbench 5.5.2 (CLC bio, Aarhus, Denmark). Pour les alignements multiples générés, le logiciel CLC MainWorkbench 5.5.2 a utilisé l'algorithme d'alignement multiple de Clustal (Thompson *et al.*, 1997). Pour la correction des séquences VHB et VHD, les séquences de référence AM184126 (VHB A3) et CAM-dFr 55(AJ583872) (VHD) d'origine camerounaise et tirée de Genbank ont été utilisées.

II.7.6.2. Dessin et manipulation des arbres

Les arbres construits dans MEGA 5.05 ont été dessinés avec le programme TreeExplorer de MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) tandis que ceux obtenus avec le logiciel PhyML 3.0 ont été dessinés avec le logiciel NJPlot (Perriere & Gouy, 1996). En plus de visualiser l'arbre et les valeurs de "*bootstrap*" au niveau de chaque nœud de l'arbre, le logiciel NJPlot permet également de modifier le taxon servant à orienter l'arbre (*outgroup*).

II.7.7. Technique de recherche des mutations sur les gènes d'intérêt clinique du VHB

Pour la recherche des mutations sur les gènes d'intérêt clinique du VHB, le logiciel CLC Main Workbench version 5.7.1 a été utilisé. Ces mutations décrites dans la littérature ont été identifiées sur la séquence de référence. En alignant les souches et en les comparant avec les souches de référence, nous étions parvenus à identifier les mutations existantes. La confirmation de ces mutations était faite en traduisant les séquences d'acides nucléiques en séquences protéiques des régions entourant ces mutations. Ainsi, les mutations de résistance aux antiviraux, les mutations de la région pré-core / core, les mutations d'échappement vaccinal et du diagnostic, les mutations dans la région X ont été recherchées.

II.7.7.1 Recherche des sites de recombinaison génétique.

Pour visualiser le degré de similarités locales entre les séquences des souches très proches dans certaines régions du génome, les identités entre les séquences alignées prises deux à deux ont été calculées en utilisant le logiciel SimPlot (Lole *et al.*, 1999). Les diagrammes de similarité ont été générés avec des fenêtres de 200 résidus nucléotidiques, des incréments de 20 résidus, le modèle de substitution Kimura 2-paramètres et un ratio de transition-transversion (Ts/Tv) égale à 10.

II.7.7.2. Dépôt des séquences dans les banques de données

Les séquences nucléotidiques du génome de VHB et VHD, déterminées au cours de ce travail, ont été déposées dans la banque de données GenBank (National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) en vue de son accessibilité à la communauté scientifique.

II.8 Analyses statistiques

Les intervalles de confiance (IC à 95%) des prévalences et les comparaisons des moyennes ont été réalisées avec le logiciel Epi info 6.0 et seules les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées significatives.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 RESULTATS

III.1.1 Séroprévalence de l'AgHBs et des Ac anti-VHD chez les porteurs chroniques de VHB, pygmées et les PNH du Cameroun

III.1.1.1 Portage de l'AgHBs chez les porteurs chroniques de VHB et les pygmées

➤ Distribution des charges virales VHB Chez les porteurs chroniques de VHB

La **figure 18** ci-dessous présente la distribution des valeurs de charges virales en fonction du nombre d'échantillons. Cette figure montre que 101 patients avaient une charge virale plasmatique du VHB indétectable (inférieure au seuil de détection de la technique (< 12 UI/mL) alors que 132 échantillons étaient détectables. Parmi les échantillons détectables, 36/132 (27,27%) avaient une charge virale élevée c'est-à-dire au-dessus de $5 \log_{10}$.

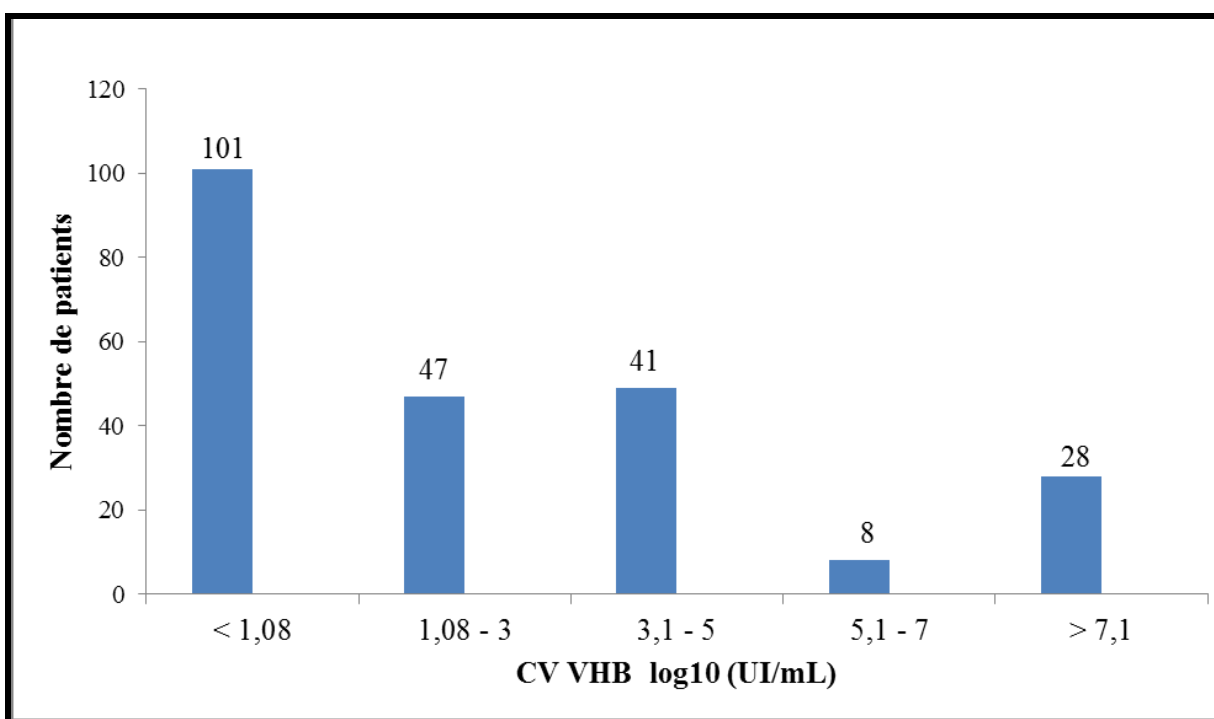


Figure 18. Distribution des charges virales VHB en fonction du nombre de patients.

Les chiffres au-dessus de chaque bande indiquent le nombre d'individus de la classe. $> 7,1$ indique les individus de charge virale au-dessus du seuil supérieur de la technique et $< 1,08$ indique les individus présentant une charge virale indétectable.

➤ Séroprévalence de l'AgHBs chez les pygmées

Les plasmas de 524 Pygmées (364 Baka, 101 Bakola et 59 Bedzam) ont été testés pour la recherche de l'AgHBs parmi lesquels 62/524 [11,8% ; IC95% : 9,2-14,9%] ont été trouvés positifs. La séroprévalence était de 10,2% (IC95% : 7,3-13,7%) chez les pygmées Baka; 18,8% (IC95% : 11,7-27,8%) chez les pygmées Bakola et de 10,2% (IC95% : 3,8-20,8%) chez les pygmées Bedzam. La comparaison des taux de séroprévalence de l'AgHBs en fonction de l'âge dans les trois groupes ethniques pygmées a montré taux relativement plus élevé chez les enfants âgés de moins de 10 ans (**Tableau XIII**).

Tableau XIII: Séroprévalence de l'AgHBs dans les groupes ethniques Pygmées (Baka, Bakola, Bedzam) du Cameroun en fonction des tranches d'âge.

Age	n/N (%; IC95%)			
	Baka	Bakola	Bedzam	Total
≤ 10	4/17 (23,5 ; 6,8-49,9)	13/66 (19,7 ; 10,9-31,2)	0	17/83 (20,5 ; 12,4-30,8)
11-20	9/69 (13,0 ; 6,1-23,3)	6/35 (17,1 ; 6,6-33,6)	1/9 (11,1 ; 0,2-48,2)	16/113 (14,2 ; 8,3-22,0)
21-30	10/89 (11,2 ; 5,5-19,7)	0	2/20 (10,0 ; 1,2-31,7)	12/109 (11,0 ; 5,8-18,4)
31-40	6/80 (7,5 ; 2,8-15,6)	0	3/13 (23,1 ; 5,0-53,8)	9/93 (9,7 ; 4,5-17,6)
41-50	4/49 (8,2 ; 2,3-19,6)	0	0/8	4/57 (7,0 ; 1,9-17,0)
>50	4/60 (6,6 ; 1,8-16,2)	0	0/9	4/69 (5,8 ; 1,9-14,2)
Total	37/364 (10.2 ; 7.3-13.7)	19/101 (18,8 ; 11,7-27,8)	6/59 (10.2 ; 3,8-20,8)	62/524 (11,8 ; 9.2-14,9)

n, nombre d'échantillons positifs en AgHBs ; N, nombre d'échantillons testés ; %, séroprévalence ; IC95%, Intervalle de Confiance à 95%.

III.1.1.2. Séroprévalence de l'AgHBs chez les PNH

Dans ce travail, 366 échantillons de PNH (185 grands singes dont 159 chimpanzés et 26 gorilles ; et 181 petits singes comprenant 14 espèces de la famille de *Cercopithecidae*) ont été analysés pour la recherche de l'AgHBs. Le **tableau XIV** présente les différentes espèces de PNH testés ainsi que les séroprévalences de l'AgHBs dans chacune de ces espèces. Au total, l'AgHBs

a été détecté chez 19 (5,2% ; IC95% : 2,9-7,5%) PNH. La séroprévalence de l'AgHBs était significativement plus élevée chez les grands singes que chez les petits singes (7,6% chez les grands singes contre 2,8% chez les petits singes, $p < 0,05$). Cette séroprévalence n'était par contre pas différente de façon significative entre les deux espèces de grands singes testées (6,9% chez les chimpanzés contre 11,5% chez les gorilles, $p = 0,45$). L'AgHBs n'a été retrouvé que chez 4 des 14 espèces de petits singes : le Babouin vert (8%), le cercocebe agile (7,7%), le moustac (14,3%) et le cercopithèque de Preuss (10%).

Tableau XIV : Séroprévalence de l'AgHBs chez les PNH du Cameroun.

Nom de l'espèce en français	Nom scientifique	n/N (%; IC95%)
Grands singes		14/185 (7,6; 3,8-11,4)
Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	11/159 (6,9; 3-10,8)
Gorille	<i>Gorilla gorilla</i>	3/26 (11,5; 0,76-23,7)
Petits singes		5/181 (2,8; 0,4-5,2)
Babouin vert	<i>Papio anubis</i>	2/25 (8; 2,6-18,6)
Mandrill	<i>Mandrillus sphinx</i>	0/16
Drill	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	0/34
Singe rouge	<i>Erythrocebus patas</i>	0/10
Mangabey joues grises	<i>Lophocebus albigena</i>	0/1
Cercocebe agile	<i>Cercocebus agilis</i>	1/13 (7,7; 6,8-22,2)
Mangabey bonnet rouge	<i>Cercopithecus torquatus</i>	0/13
Cercopithèque tantale	<i>Cercopithecus aethiops tantalus</i>	0/12
Moustacs	<i>Cercopithecus cephus</i>	1/7 (14,3; 11,6-40,6)
Moustacs à oreilles rousses	<i>Cercopithecus erythrotis</i>	0/6
Cercopithèque mona	<i>Cercopithecus mona</i>	0/12
Cercopithèque de Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	0/5
Hocheur	<i>Cercopithecus nictitans</i>	0/17
Cercopithèque de Preuss	<i>Cercopithecus preussi</i>	1/10 (10; 8,5-28,6)

n, nombre d'échantillons positifs en AgHBs ; N, nombre d'échantillons testés ; %, séroprévalence ; IC95%, Intervalle de Confiance à 95%.

III.1.1.3. Séroprévalence des Ac anti-VHD (anti delta)

III.1.1.3.1. Séroprévalence des Ac anti-VHD (anti delta) chez les porteurs chroniques de VHB

Chez les porteurs chroniques de VHB, 233 patients porteurs d'AgHBs ont été testés pour la présence des Ac anti-VHD. Au total 41 individus ont été trouvés positifs [17,6% ; IC95% : 12,7-22,5%]. L'ARN du VHD a été détecté chez 25 des 41 individus porteurs d'anticorps delta ; indiquant ainsi la réplication du VHD chez 61% (25/41) avec un IC95% : 46,1-75,9% des patients porteurs chroniques VHB porteurs d'Ac anti VHD. Les taux de détection d'anticorps anti delta ont été présentés dans le **tableau XV** par tranche d'âge et les résultats bruts sont présentés en annexe 6.

Tableau XV : Séroprévalence de l'anticorps delta chez les porteurs chroniques du VHB du Cameroun.

Tranche d'âge	n/N (%; IC95%) Anticorps delta	n'/N' (%; IC95%) Détection de l'ARN delta
≤ 10	0/1	0
0-20	7/17 (41,2 ; 19,4-68)	5/7 (71,4 ; 36,9-100,9)
21-30	5/47 (10,6 ; 1,8-19,4)	3/5 (60 ; 17,1-102,9)
31-40	10/50 (20 ; 9-30)	5/10 (50 ; 19,1-80,9)
41-50	12/50 (24 ; 12,2-35,8)	8/12 (66,6 ; 39,9-93,3)
>50	7/69 (10,1 ; 3-17,2)	4/7 (57,4 ; 20,8-94)
Total	41/233 (17,6 ; 12,7-22,5)	25/41 (61 ; 46,1-75,9)

n, nombre d'échantillons positifs en anticorps delta ; N, nombre d'échantillons testés ; %, séroprévalence ; IC95%, n', nombre d'échantillons positifs en ARN ; N' nombre d'échantillons testés pour la détection de l'ARN delta

III.1.1.3.2. Séroprévalence des Ac anti-VHD (anti delta) chez les pygmées

Un total de 52/62 échantillons de Pygmées positifs à l'AgHBs était disponible pour la recherche des Ac anti-VHD. Parmi ceux-ci, 36 ont été trouvés positifs [69,2%, IC95% : 56,2-81,7%]. L'ARN du VHD a été détecté chez 16 des 36 individus porteurs d'Ac anti-VHD, indiquant ainsi la réplication du VHD chez 44,4% (16/36) avec un IC95% : 28,2-60,6% des

Pygmées porteurs d'Ac anti VHD. Les taux de détection d'anticorps anti delta ont été présentés dans le **tableau XVI** par tranche d'âge et les résultats bruts sont présentés en annexe 6.

Tableau XVI : Séroprévalence de l'anticorps delta chez les groupes ethniques pygmées du Cameroun.

Age	n/N (%; IC95%)			
	Baka	Bakola	Bedzam	Total
≤ 10	1/3 (33,3 ; -20-86,6)	3/8 (37,5 ; 4-71)	0	4/11 (36,6 ; 8,1-65,1)
11-20	4/7 (57,1 ; 20,5-93,7)	1/5 (20 ; -15,1-55,1)	1/1 (100)	6/13 (46,2 ; 19,1-73,3)
21-30	8/9 (88,8 ; 68,2-109,4)	0	2/2 (100)	10/11 (90,9 ; 73,9-107,9)
31-40	6/6 (100)	0	3/3 (100)	9/9 (100)
41-50	4/4 (100)	0	0	4/4 (100)
>50	3/4 (75 ; 32,6-117,6)	0	0	3/4 (75 ; 32,6-117,6)
Total	26/33 (78,8 ; 64,9-92,7)	4/13 (30,8 ; 5,7-55,9)	6/6 (100)	36/52 (69,2 ; 56,2-81,7)

n, nombre d'échantillons positifs en Ac anti delta ; N, nombre d'échantillons testés ; %, séroprévalence ; IC95%, Intervalle de Confiance à 95%.

III.1.1.3.3. Séroprévalence des Ac anti-VHD (anti delta) chez les PNH

Tous les échantillons des PNH positifs à l'AgHBs étaient négatifs à la recherche des Ac anti-VHD.

III.1.2. Diversité génétique du VHB et du VHD dans les populations humaines et simiennes du Cameroun

III.1.2.1. Diversité génétique du VHB dans les populations humaines

a) Détection qualitative des différents fragments de VHB

Après amplification des différents fragments de VHB, les révélations ont été faites sur gel d'agarose et les bandes à la taille attendue ont été obtenues. La **figure 19** ci-dessous présente les photos de gel de quelques échantillons amplifiés au niveau de chaque fragment subgénomique.

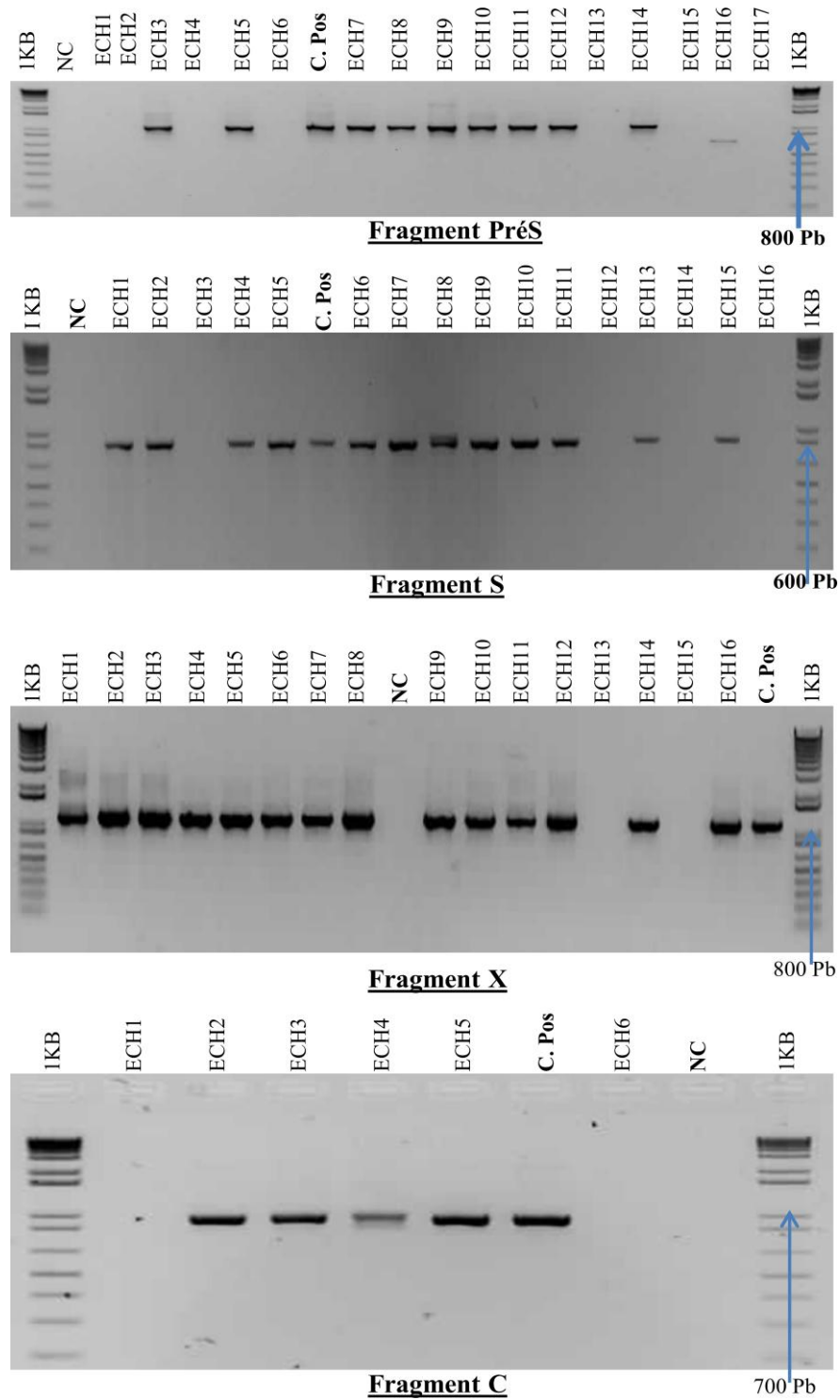


Figure 19 : Electrophorégrammes des différents fragments subgénomiques amplifiés du VHB

Les tailles attendues des fragments subgénomiques PrS, S, X et C du VHB étaient de 800 Pb, 600 Pb, 700 Pb et 800, Pb respectivement.

b) Distribution des génotypes et sous génotypes du VHB chez les porteurs chroniques du VHB

Dans l'objectif de déterminer les génotypes du VHB circulant dans cette population, les ADN extraits des plasmas de 132 individus ayant des charges virales détectables ont été amplifiés et séquencés au niveau d'un fragment de la région de la polymérase (gène Pol) du VHB. Sur les 132 échantillons testés, 123/132 (93,2%) ont été amplifiés et séquencés avec succès au niveau de cette région. Les génotypes/sous-génotypes ont été déterminés par analyse phylogénétique avec les séquences nucléotidiques de référence disponibles dans les banques de séquences.

L'analyse de l'arbre phylogénétique obtenu (**Figure 20**) montre que 63/123 (51,22 %) des échantillons étaient de génotype A, 59/123 (48,4 %) de génotype E et 1/123 (0,81%) échantillon était de génotype D.

Une importante variabilité intra-génotypique a été observée au sein des isolats de génotype A avec circulation de 4 sous-génotypes distincts (A2, A3, A5 et A7) et de nombreux sous-génotypes non encore classés : 1/63(1,6%) sous-génotype A2, 27/63(42,8%) sous-génotypes A3, 3/63(4,8%) sous-génotypes A5, 3/63(4,8%) sous-génotypes A7 et 29/63(46%) sous-génotypes A non encore classés. Les sous-génotypes A non encore classés ont partagé la même racine phylogénétique que les sous génotypes A3, A5 et A7 décrits au Cameroun et au Nigeria avec une valeur de bootstrap significative (87).

Par contre, tous les isolats de génotype E sont regroupés au sein d'un seul cluster avec une valeur de bootstrap de 100% montrant une très faible variabilité intra-génotypique au sein de ce génotype.

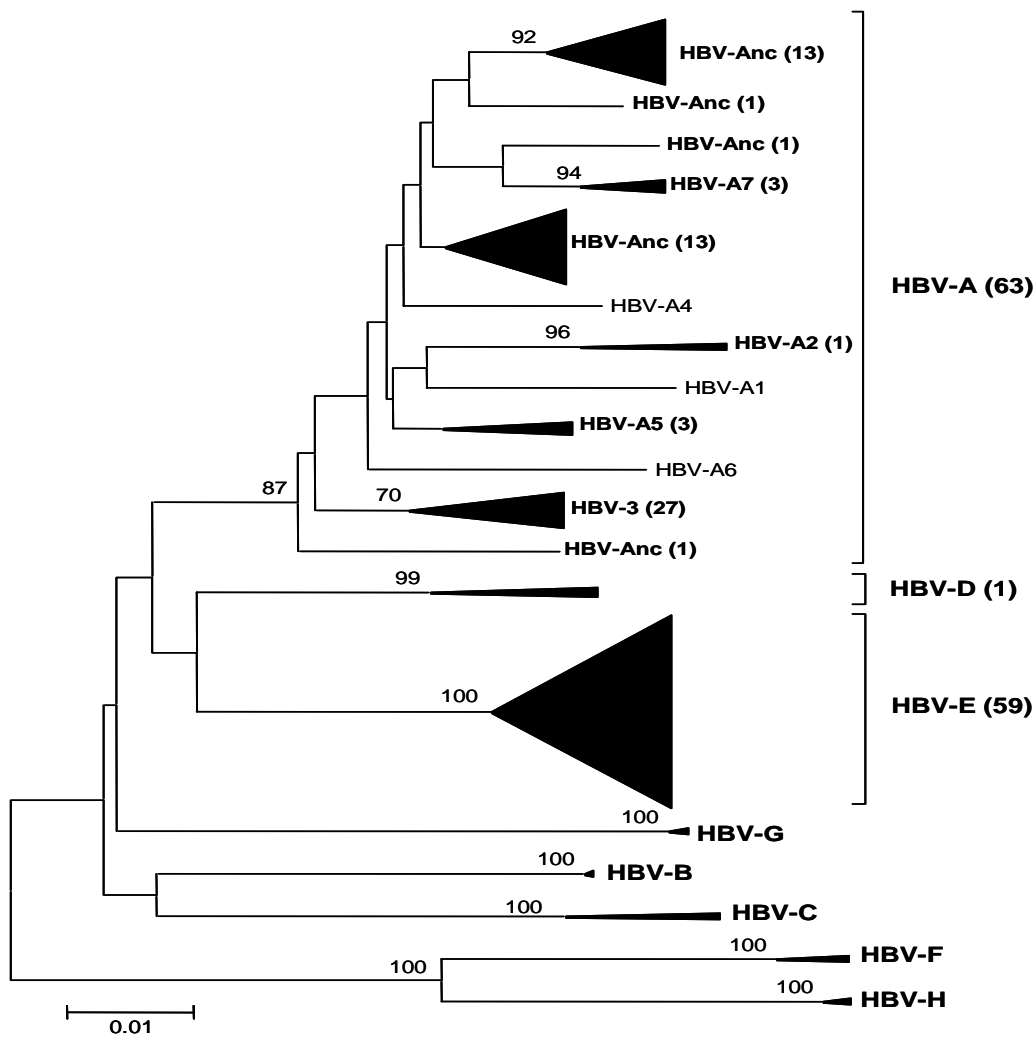


Figure 20 ; Relation phylogénétique des souches VHB des porteurs chroniques de VHB basé sur le gène Pol.

Arbre phylogénétique construit par la méthode du plus proche voisin et les distances génétiques calculées par le modèle de Kimura 2 parameters. Illustration des relations génétiques entre les isolats du VHB obtenus chez les populations des porteurs chroniques de VHB du Cameroun (le chiffre entre parenthèse indique le nombre de souches de même sous génotypes) et les souches de référence qui sont suivies du génotype ou du sous génotype. L'arbre a été construit à partir d'un alignement des séquences d'un fragment de la région polymérase du VHB.

Dans l'objectif de confirmer les génotypes des souches obtenus par analyse phylogénétique de la région polymérase du génome du VHB, seulement 53/123 (43,1%) échantillons ont pu être amplifiés et séquencés avec succès au niveau de quatre fragments subgénomiques (PréS, S, C et X). Parmi ceux-ci 34/53 (64,15%) étaient de génotype A et 19/53 (35,85%) de génotype E. Après analyse phylogénétique, les résultats de génotypage obtenus étaient concordants avec ceux trouvés par génotypage à partir du gène Pol (**Figure 21**).

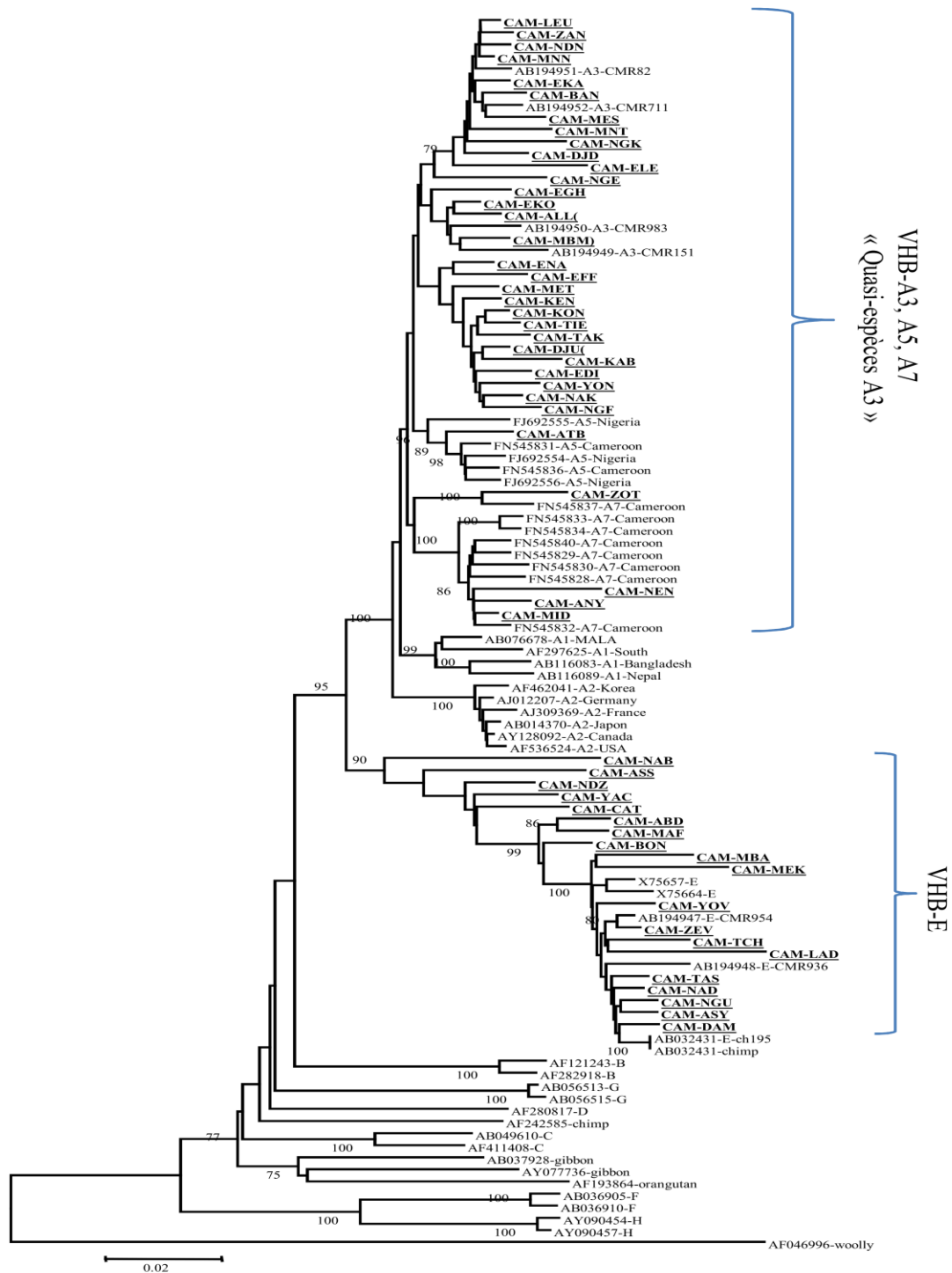


Figure 21 : Relation phylogénétique des souches VHB des porteurs chroniques VHB basée sur le génome complet.

Arbre phylogénétique construit par la méthode du plus proche voisin et les distances génétiques calculées par le modèle de Kimura 2 parameters et illustration des relations génétiques entre les isolats du VHB obtenus chez les porteurs chroniques VHB du Cameroun et les souches de référence à partir d'un alignement des séquences du génome complet ~3200 Pb. Les analyses génétiques ont été conduites dans MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Les souches des porteurs chroniques VHB sont en gras et soulignées et les autres sont les souches de référence. Seules les valeurs de bootstrap > 70% ont été montrées

c) Chez les pygmées

Pour étudier la diversité génétique des souches VHB chez les pygmées, 22 sur 62 échantillons de pygmées AgHBs positifs étaient disponibles en termes de quantité de matériel biologique répartis comme suit : 15 pygmées Baka, 5 Bakola et 2 Bedzam. Pour déterminer les génotypes de VHB circulant dans cette population, les séquences d'un fragment du gène S d'environ 423 pb ont été amplifiées et séquencées. Le génotypage par l'analyse phylogénétique de ces 22 séquences avec les séquences nucléotidiques de référence a montré que 17/22 (77,3 %) étaient de génotype A et 5/22 (23,7%) de génotype E (**Figure 22**). Toutes les souches du génotype A se groupent dans le même cluster que les sous-génotypes A3, A4 et A5. De façon intéressante, les 15 individus de l'ethnie Baka se sont groupés avec le sous-génotype A3, tandis qu'une co-circulation des génotypes A et E a été observée pour les individus des ethnies Bakola (1 VHB-A et 4 VHB-E) et Bedzam (1 VHB-A et 1 VHB-E).

Dans le but de confirmer les résultats obtenus avec le fragment de gène S, dix des 22 souches identifiées ont pu être amplifiées et séquencées en génomes complets (environ 3200 pb) dont 5 souches de génotype A et 5 du génotype E. Les 5 souches de génotype A se sont groupées avec une valeur de bootstrap de 99% avec la souche de génotype A3 de numéro d'accès AB194950 précédemment identifiée chez un porteur chronique de VHB du Cameroun (**Figure 23**). Les 5 souches de génotype E décrites avec le gène S ont été aussi confirmées comme appartenant à ce génotype E dont les souches se sont groupées avec une valeur de bootstrap de 100%.

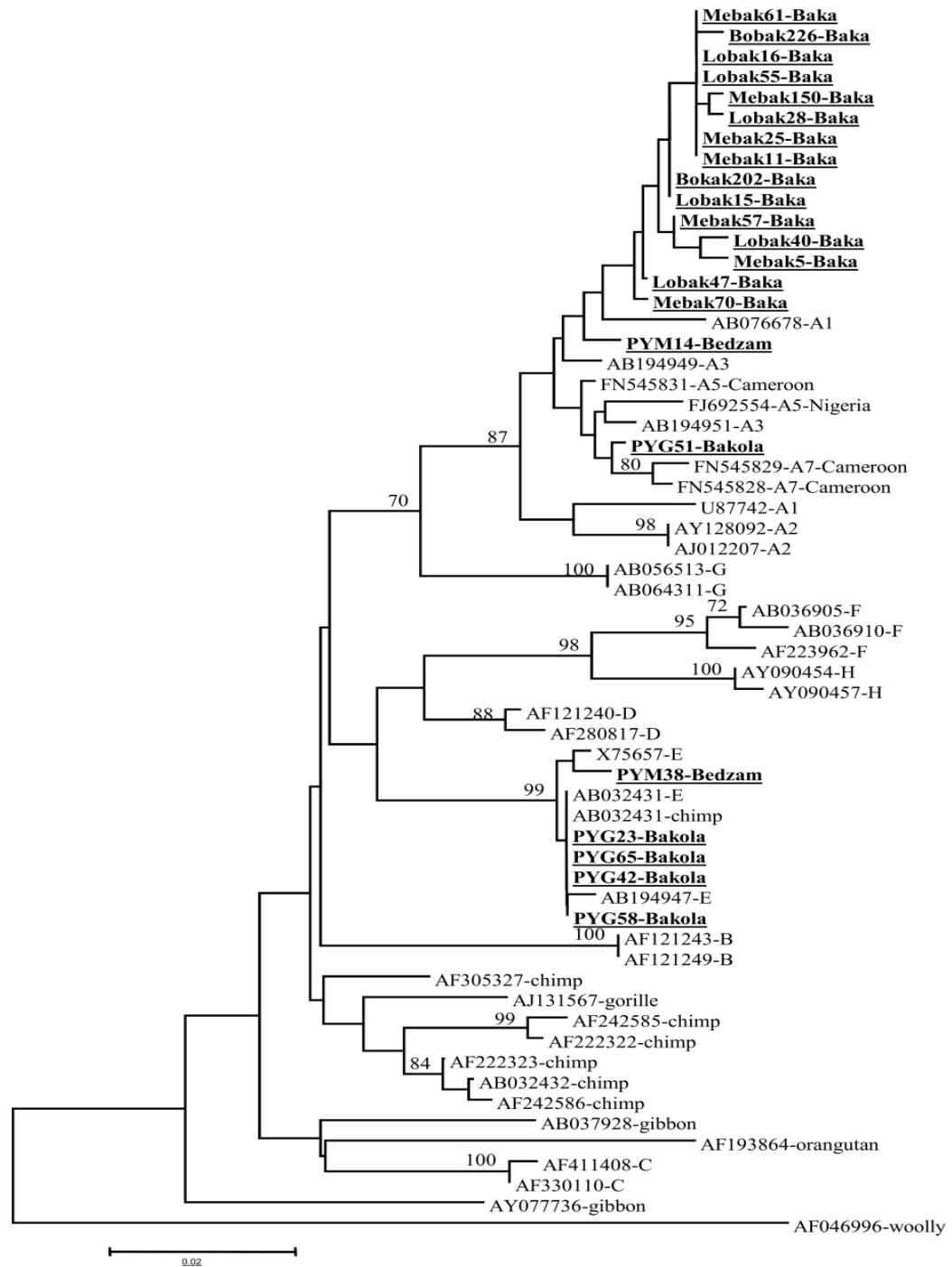


Figure 22 : Relations phylogénétiques entre les souches de VHB circulant dans les groupes ethniques pygmées du Cameroun.

Arbre phylogénétique construit par la méthode du plus proche voisin et les distances génétiques calculées par le modèle de Kimura 2 parameters et illustration des relations génétiques entre les isolats du VHB obtenus chez les pygmées du Cameroun et les souches de référence à partir d'un alignement des séquences du génome complet ~3200 Pb. Les analyses génétiques ont été conduites dans MEGA5. Les souches des pygmées sont en gras et soulignées. Seules les valeurs de bootstrap > 70% ont été montrées.

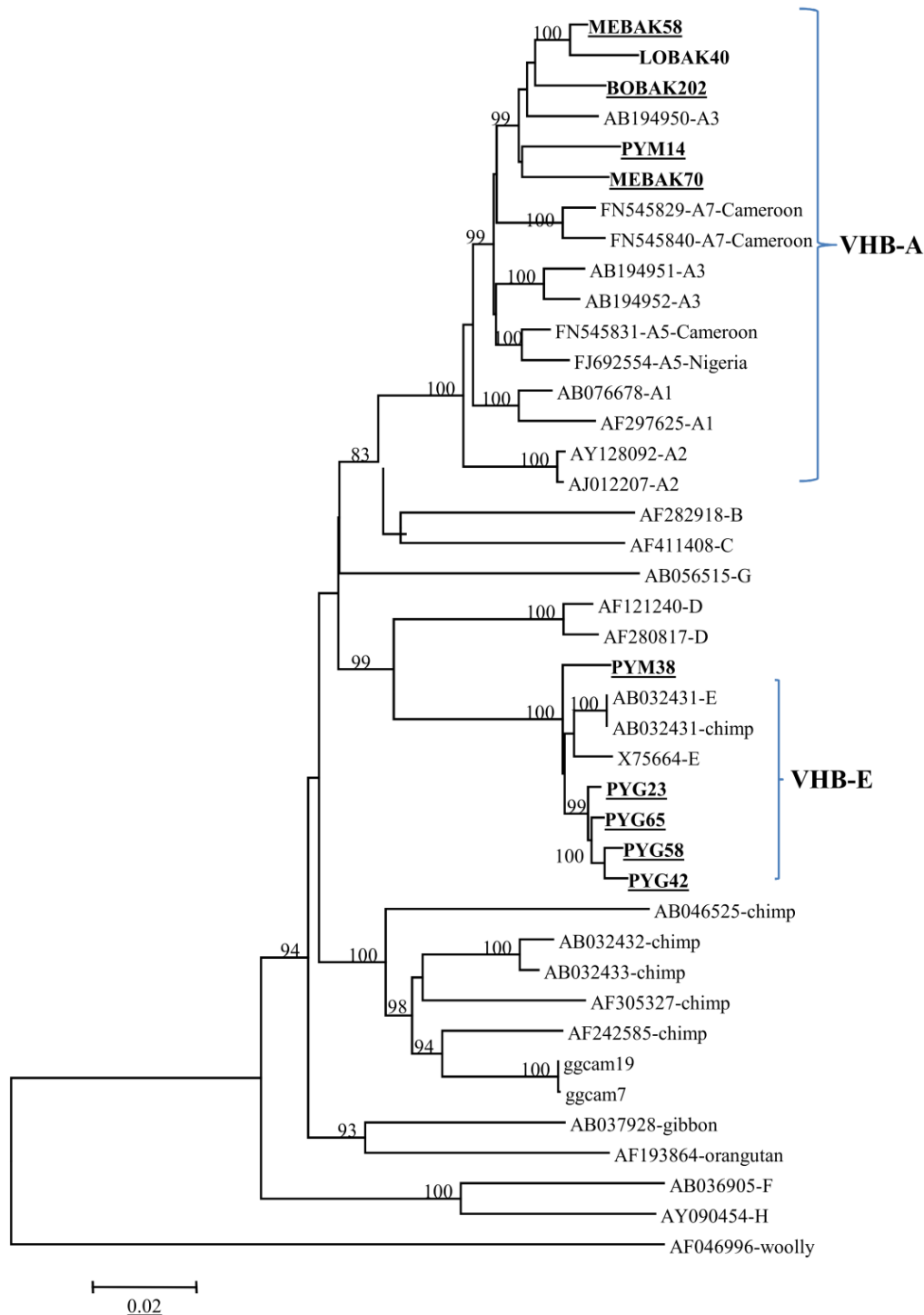


Figure 23 : Relation phylogénétique des VHB des Pygmées basée sur le génome complet.

Arbre phylogénétique construit par la méthode du plus proche voisin et les distances génétiques calculées par le modèle de Kimura 2 parameters et illustration des relations génétiques entre les isolats du VHB obtenus chez les populations Pygmées du Cameroun et les souches de référence à partir d'un alignement des séquences du génome complet ~3200 Pb. Les analyses génétiques ont été conduites dans MEGA5. Les souches des porteurs chroniques VHB sont en gras et soulignées. Seules les valeurs de bootstrap > 70% ont été montrées.

III.2.2. Diversité génétique du VHB chez les PNH

a) Chez les grands singes chimpanzés et gorilles

Les ADN obtenus des échantillons des chimpanzés et gorilles positifs en AgHBs ont été amplifiés et séquencés au niveau d'un fragment du gène de surface du VHB. Les séquences ont pu être obtenues pour 8/11 (72,7%) chimpanzés et 3/3 (100%) gorilles. L'analyse phylogénétique a été réalisée en comparant ces séquences avec 33 séquences de référence tirées de Genbank comprenant les souches de VHB humains et simiens. Concernant les chimpanzés, 7 séquences de VHB des chimpanzés de la sous espèce *Pan troglodytes vellerosus* se sont groupées avec les séquences VHB de référence de chimpanzé de même la sous espèce dans un cluster ayant une valeur de bootstrap inférieure à 70%. De la même façon une séquence de VHB de chimpanzé de la sous espèce *Pan troglodytes troglodytes* a formé un cluster ayant une valeur de bootstrap de 91% avec les séquences de VHB de référence de chimpanzés de la même sous espèce (**Figure 24**). Par ailleurs, les trois séquences de gorilles se sont groupées avec une valeur de bootstrap de 97% avec la seule séquence de référence du VHB de gorille existant dans Genbank. Ces résultats indiquent une certaine association entre le VHB, les espèces et les sous espèces de PNH.

Dans l'objectif de confirmer les résultats de l'analyse phylogénétique basée sur le gène S, les trois échantillons de gorilles (ggcam19, ggcam7 et ggcam22), un échantillon de *Pan troglodytes troglodytes* (cpzcam17) et un échantillon de *Pan troglodytes vellerosus* (cpzcam6) ont été choisis pour l'amplification et séquençage des génomes complets du VHB. L'analyse phylogénétique sur la base des séquences complètes a montré une bonne concordance avec celle obtenue sur la base du fragment de gène S (**Figure 25**). Les génomes complets obtenus de chacune des 5 souches avaient une taille de 3182 pb. Les trois séquences de gorilles comparées entre elles ont présenté un pourcentage de similitude de 99,3-99,9% et un taux de similitude de 93,8-95,3 lorsqu'elles sont comparées aux souches de chimpanzés. En comparant les séquences des chimpanzés, des gorilles et d'autres groupes de PNH, des pourcentages d'identités ont été en dessous de 92% confirmant ainsi leur appartenance à des génotypes différents.

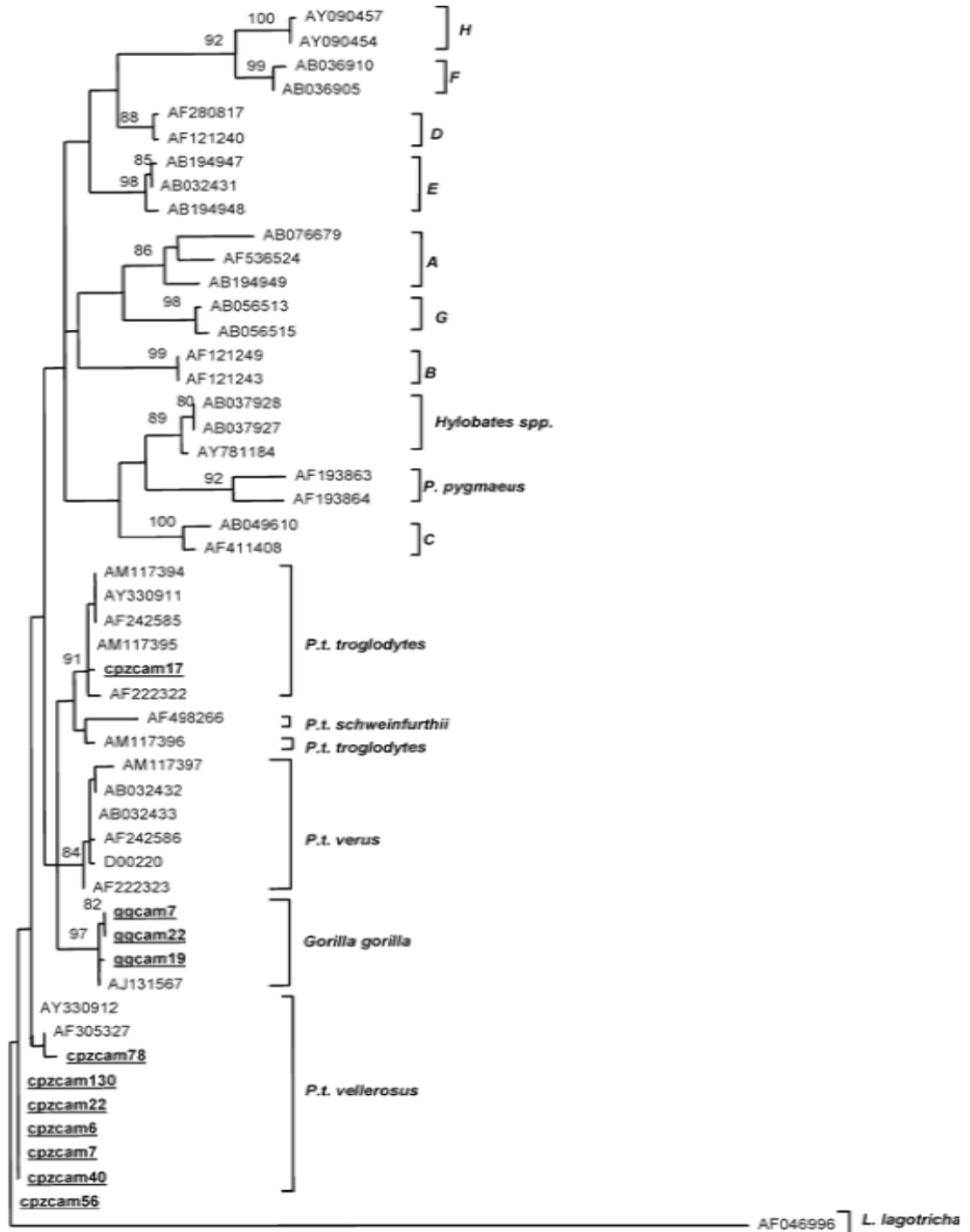


Figure 24 ; Relation phylogénétique de VHB des grands singes basé sur le gène S.

Arbre phylogénétique construit suivant la méthode de maximum de vraisemblance « Maximum Likelihood method » (Kimura M. 1980) sur un fragment de gène S d'environ 415 pb. Les analyses génétiques ont été conduites dans MEGA5. Les souches de chimpanzés (cpz) et des gorilles (gg) sont soulignées et en gras. Les souches de référence des humains (A-H) et des PNH tirées de Genbank sont représentées par leur numéro d'accès suivi des génotypes ou des noms des espèces hôtes. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont présentées.

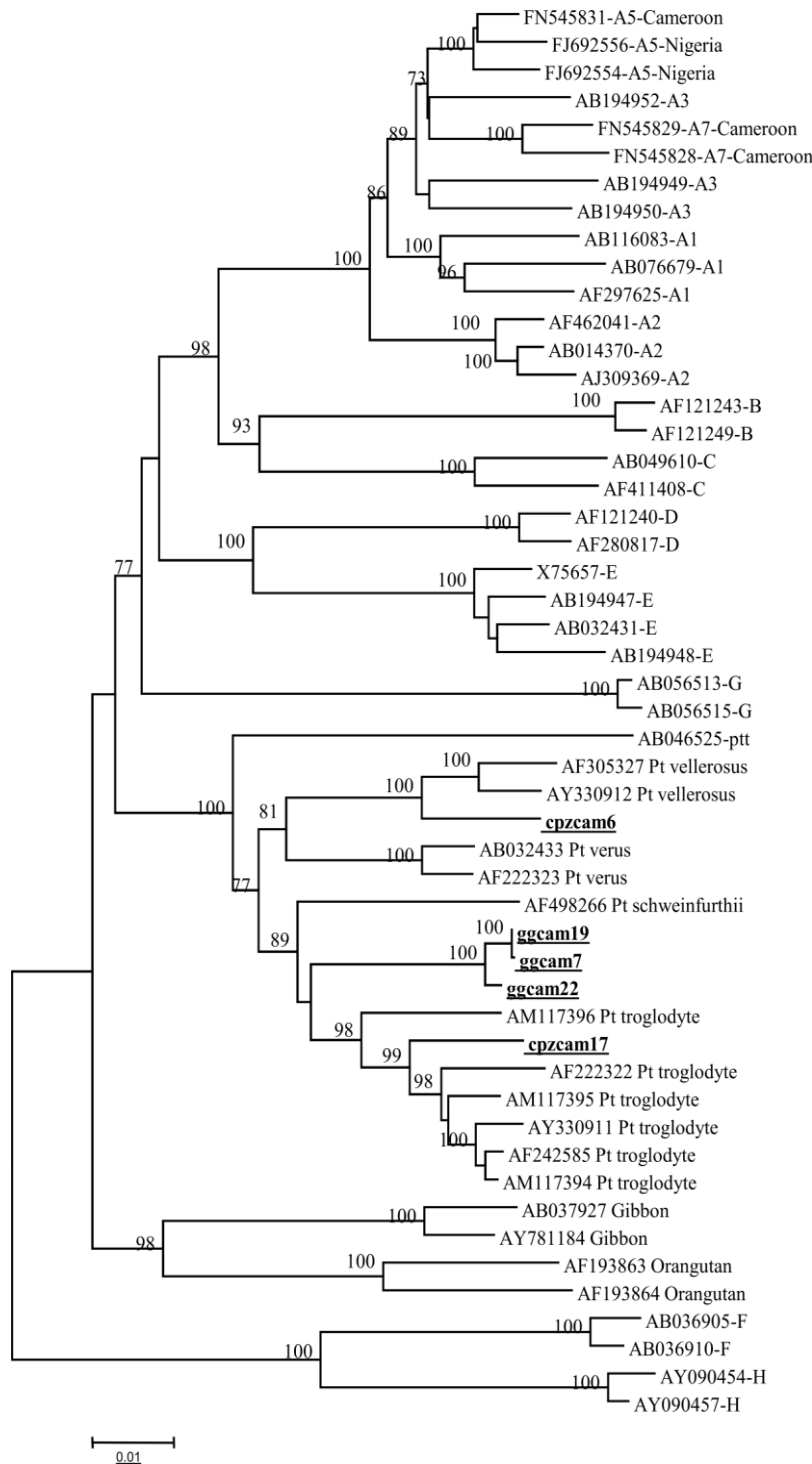


Figure 25: Relation phylogénétique basée sur les séquences de génomes complets des VHB des grands singes.

Arbre phylogénétique construit suivant la méthode du plus proche voisin « Neighbour Joining » (Saitou N. and Nei M. 1987) sur ~3200 pb. Les distances génétiques ont été calculées par la modèle de Kimura 2 parameters. Les analyses génétiques ont été conduites dans MEGA5 (Tamura K. et al., 2011). Les souches de chimpanzés (cpz) et des gorilles (gg) sont soulignées et en gras. Les souches de référence des humains (A-H) et des PNH tirées de Genbank sont représentées par leur numéro d'accès suivi des génotypes ou des noms des espèces hôtes. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70% ont été présentées.

b) Chez les petits singes de la famille des Cercopithécidae

Après plusieurs tentatives d'amplification du gène S du VHB chez les petits singes AgHBs positifs, 5 échantillons ont finalement pu être amplifiés et séquencés. Ces échantillons provenaient de : 1 *Cercopithecus cephus* (Pussy), 1 *Cercopithecus torquatus* (Akum), 1 *Mandrillus sphinx* (Sandra), 1 *Cercopithecus erythrotis* (Sokolo), 1 *Papio anubis* (Babette). L'analyse phylogénétique de ces séquences avec les séquences de référence a montré la ségrégation des souches étudiées dans deux groupes. De façon inattendue, les souches de petits singes se sont groupées dans le génotype E et dans le génotype des Chimpanzés (**Figure 26**). Ceci prend en défaut le regroupement des souches en fonction de l'espèce hôte et suggère la transmission inter-espèces du VHB entre les PNH, y compris l'homme.

Seul le génome complet de la souche du petit singe *Cercopithecus torquatus* (Akum) a été obtenu. L'analyse phylogénétique de ce génome complet a été concordante à celle obtenue avec le fragment du gène S (**Figure 27**). En effet et de façon intéressante, cette séquence de la souche d'Akum s'est groupée avec la souche de chimpanzé AF305327 avec une valeur de bootstrap de 100%. En calculant la distance génétique entre les deux souches, nous avons trouvé un taux de similitudes de 97% entre la souche d'AKUM et la souche AF305327. Ceci confirme l'appartenance des deux souches au génotype du VHB de chimpanzé (CPZ).

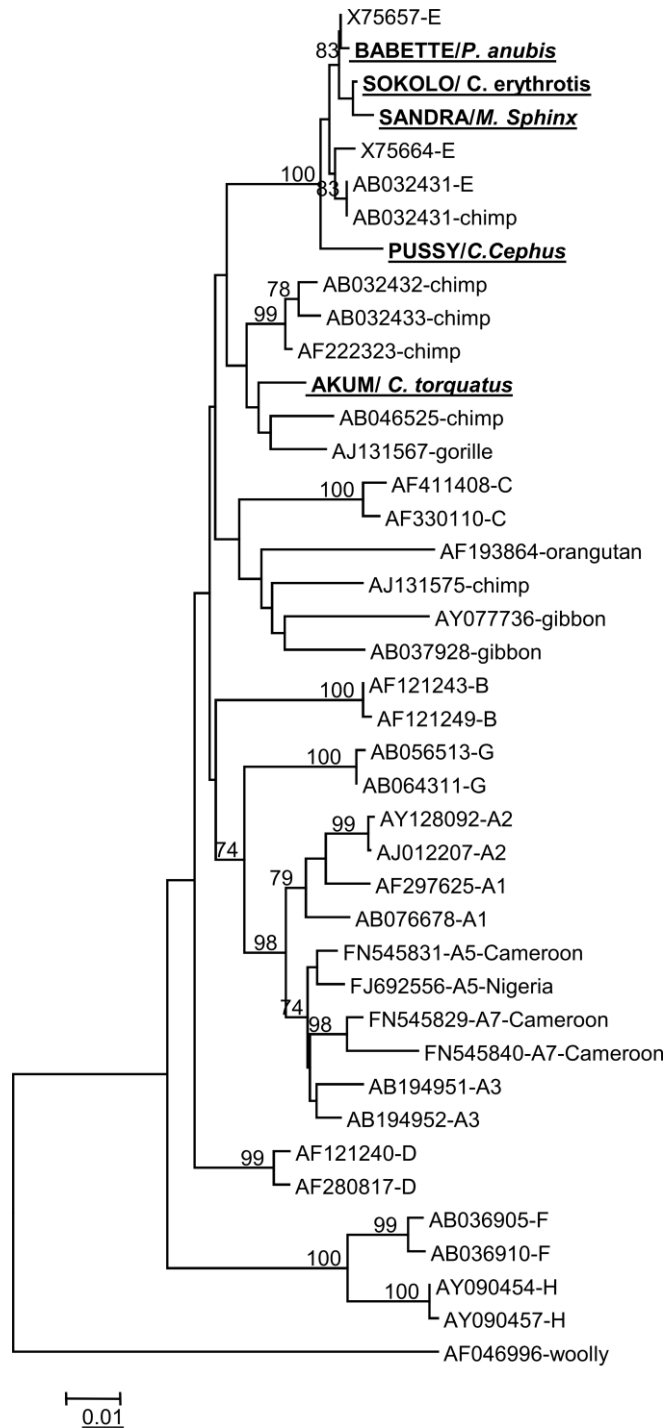


Figure 26 : Relation phylogénétique des VHB des petits singes basée sur le gène S.

Arbre phylogénétique construit suivant la méthode du plus proche voisin «Neighbour joining » (Saitou N. and Nei M. 1987) et basé sur un fragment de gène S ~415 pb. Les distances génétiques ont été calculées selon le modèle de Kimura 2 parameters. Les analyses génétiques ont été conduites dans MEGA5 (Tamura K. et al., 2011). Les souches de petits singes sont soulignées et en gras. Elles sont identifiées par le nom de l’animal suivi de son espèce. Les souches de référence des humains (A-H) et des PNH tirées de Genbank sont représentées par leur numéro d’accès suivi des génotypes ou des noms des espèces hôtes. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont présentées.

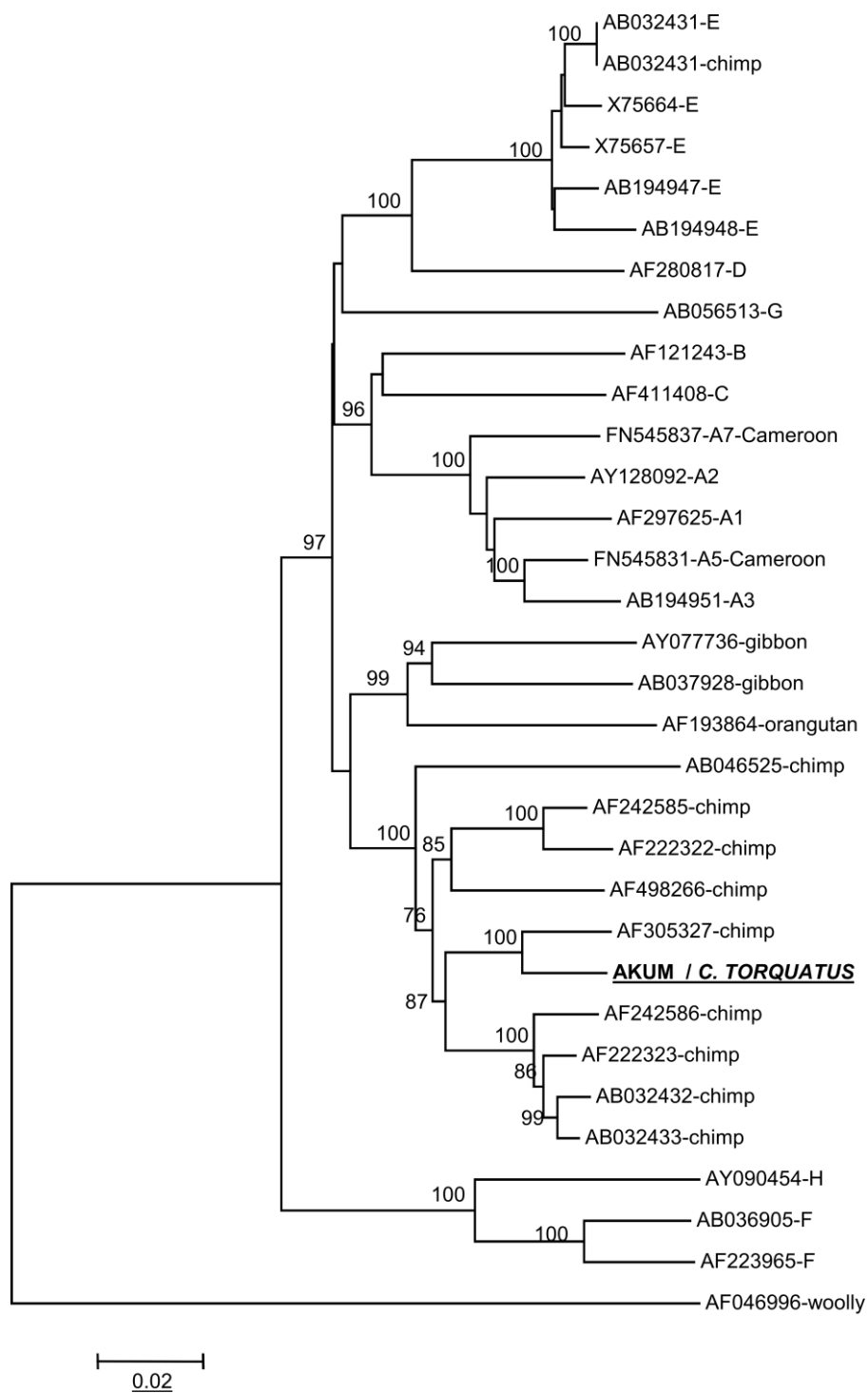


Figure 27: Relation phylogénétique du génome complet de VHB du petit singe AKUM.

Arbre phylogénétique construit suivant la méthode du plus proche voisin (Neighbour joining) et basé sur les séquences du génome complet d'environ 3200 pb. Les analyses génétiques ont été conduites dans MEGA5. La seule souche du génome complet de petit singe (AKUM) est soulignée et en gras. Elle est identifiée par le nom de l'animal suivi de son espèce. Les séquences de référence des humains (A-H) et des PNH tirées de Genbank sont représentées par leurs numéros d'accès suivis des noms des espèces hôtes. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont présentées devant les nœuds respectifs.

III.1.2.3. Diversité génétique du VHD chez les populations humaines

a) Détection qualitative des différents fragments subgénomiques du VHD.

Après amplification des différents fragments de VHD, les révélations ont été réalisées sur gel d'agarose et les bandes à la taille attendues ont été obtenues. La **figure 28** ci-dessous présente les photos de gel de quelques échantillons amplifiés par fragments subgénomique.

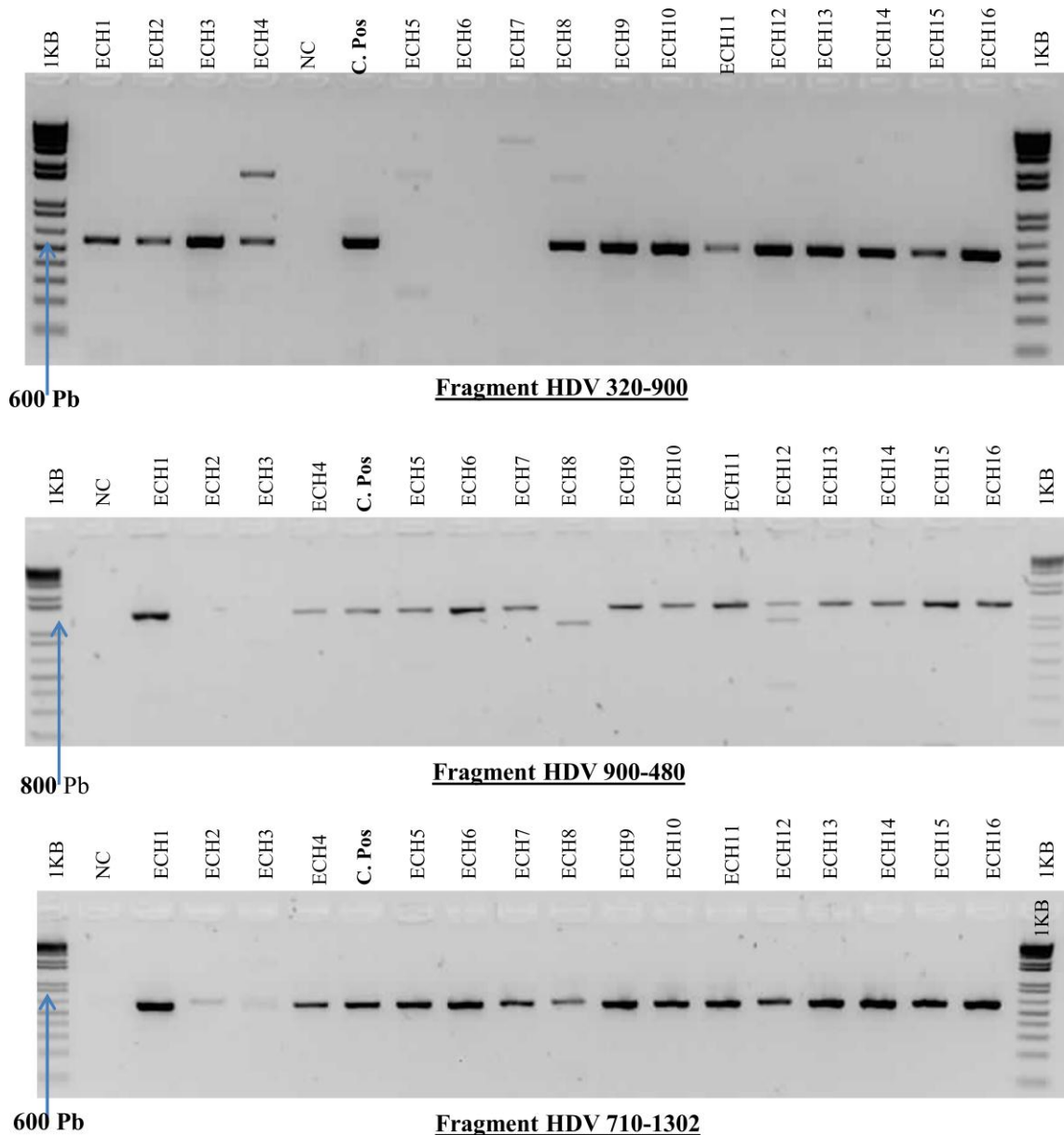


Figure 28 : Electrophorogrammes des différents fragments subgénomiques amplifiés du VHD

Les tailles attendues des fragments subgénomiques HDV 320-900, HDV 900-480 et HDV 710-1302 du VHD étaient de 550 Pb, 750 Pb, 600 Pb respectivement.

b) Chez les Porteurs chroniques du VHB

Pour étudier la diversité génétique des souches de VHD, l'ARN du VHD a été amplifié et séquencé au niveau de la région R0 chez 25 des 41 échantillons de porteurs chroniques VHB positifs en Ac anti-VHD; soit une fréquence de détection de l'ARN de 61% [IC95% : 44,5-75,4%]. L'analyse phylogénétique comparant ces 25 séquences nucléotidiques avec les séquences de référence a montré que la plupart des souches (22/25 ; 88%) étaient du génotype 1 (VHD-1). Les trois autres souches (FRM, ASO et MVM) se sont réparties dans trois clusters différents correspondant aux génotypes 5, 6, et 7 respectivement (valeurs de bootstrap de 100%, 99% et 97% respectivement) (**Figure 29**).

Une forte variabilité intra-génotypique a été observée au sein des souches de VHD de génotype 1 avec non seulement la présence de 5 clusters sur l'arbre phylogénétique mais aussi une distance génétique moyenne de 12,9%.

Dans l'objectif de confirmer les génotypes obtenus par analyse phylogénétique de la région R0 du VHD, nous avons pu générer 17 séquences de génomes complets des souches VHD identifiées chez les porteurs chroniques VHB. L'analyse phylogénétique de ces 17 séquences complètes avec les séquences de référence a confirmé une bonne concordance avec les résultats obtenus au niveau de la région R0 à savoir 14 échantillons de génotype 1 et 3 échantillons de génotypes 5, 6 et 7, respectivement (**Figure 30**).

La forte variabilité intra-génotypique observée pour les VHD de génotype 1 au niveau de la région R0 a été confirmée avec les séquences du génome complet. En effet, les 14 échantillons de génotype 1 se sont répartis en 5 différents clusters et une distance génétique moyenne de plus de 12%.

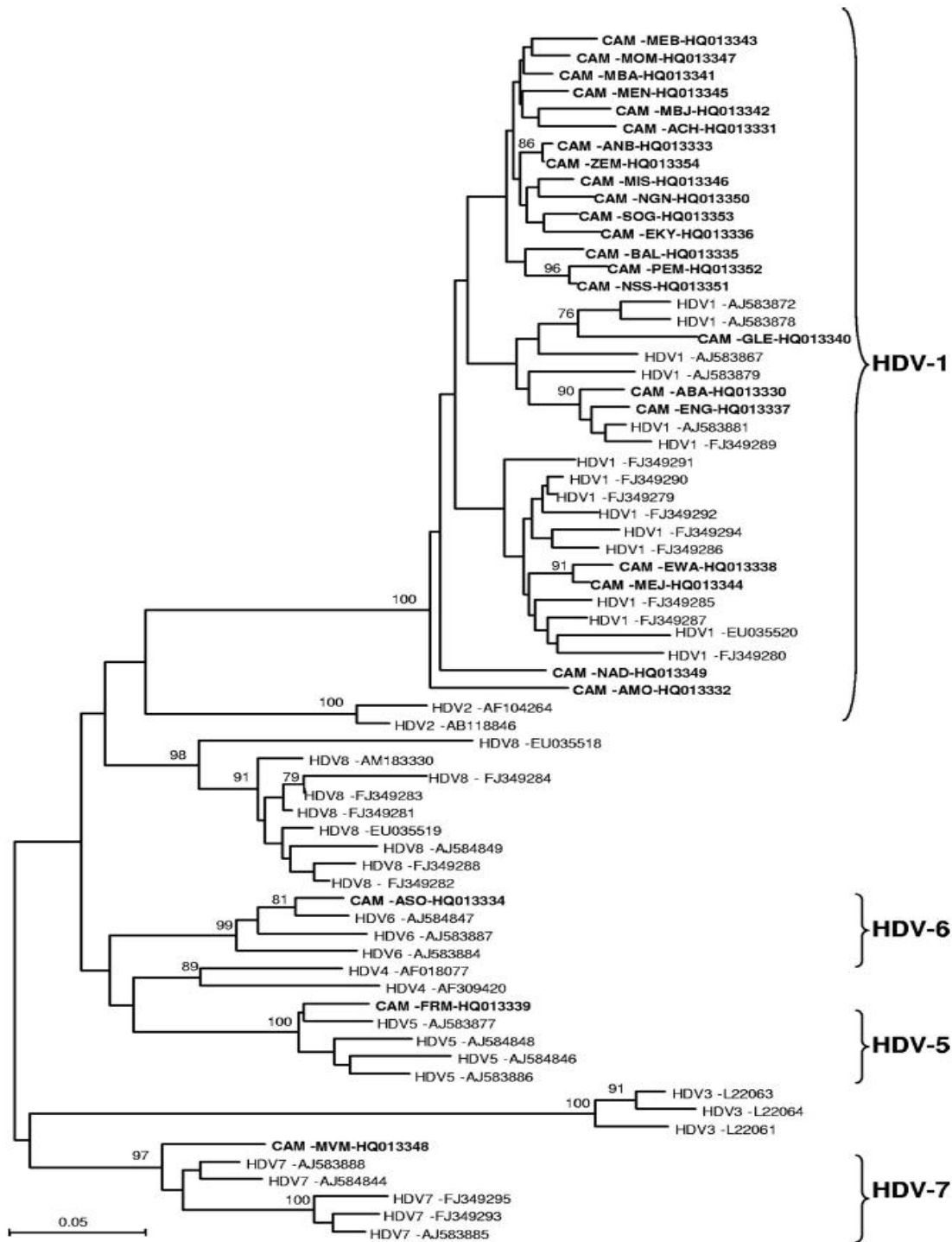


Figure 29 : Arbre phylogénétique des souches VHD de porteurs chroniques VHB au niveau de la région R0.

Phylogramme basé sur les séquences du gène sHD d'environ 360-bp suivant la méthode du plus proche voisin «Neighbor-joining». Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura two-parameter. Les 25 souches de l'étude sont en gras. Elles sont identifiées par Cam pour Cameroun suivi de trois premières lettres du nom du patient et enfin de leur code d'accès dans Genbank. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont présentées devant les nœuds respectifs.

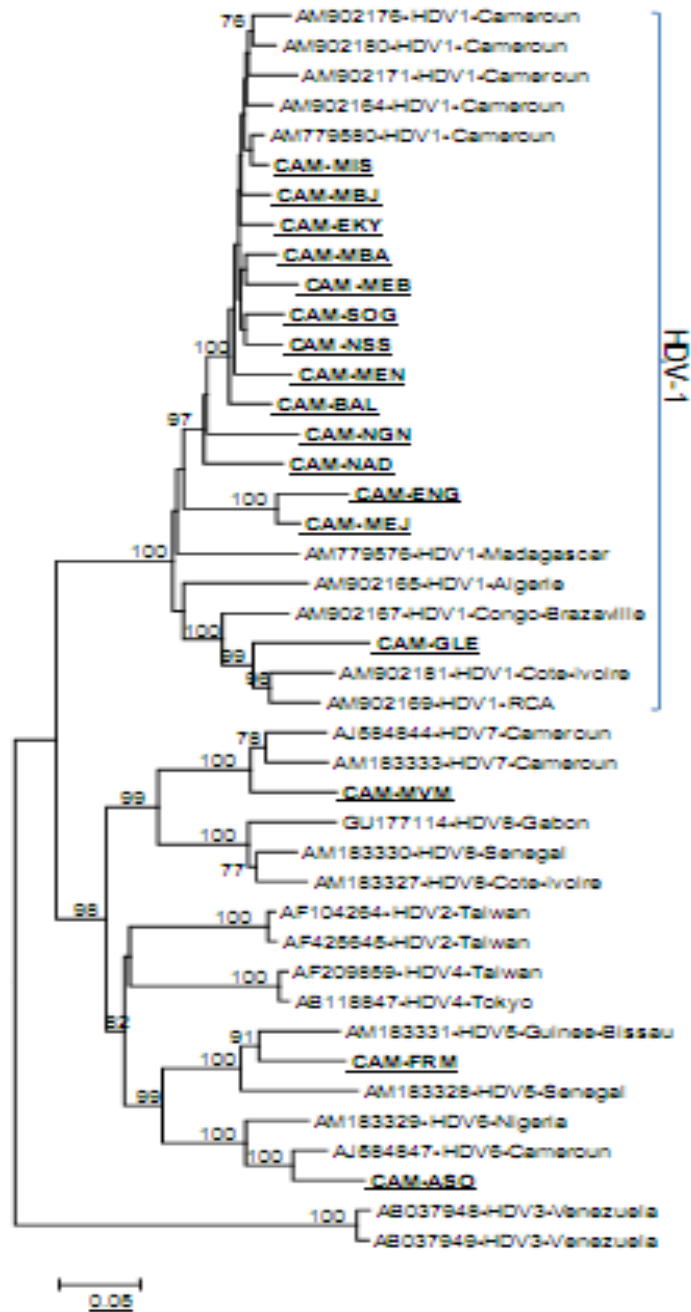


Figure 30 : Relation phylogénétique de VHD des porteurs chroniques VHB au niveau du génome complet.

Phylogramme construit sur la base des séquences du génome complet d'environ 1680 Pb. L'arbre phylogénétique a été réalisé par la méthode du plus proche voisin (Neighbor-joining). Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura two-parameter. Les 17 séquences complètes de VHD des porteurs chroniques VHB sont soulignées et en gras. Elles sont identifiées par Cam pour Cameroun suivi de trois premières lettres du nom du patient. Les souches de référence sont identifiées suivant leur code d'accès à Genbank, suivi du génotype et du pays où la souche a été identifiée. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont présentées.

c) Chez les pygmées

L'ARN du VHD a été amplifié et séquencé au niveau de la région R0 chez 18 des 36 échantillons de Pygmées positifs en Ac anti-VHD; soit une fréquence de détection de l'ARN de 50% (18/36) avec un IC95% : 33,6-66,3%. L'analyse phylogénétique comparant ces 18 séquences nucléotidiques avec les séquences de référence a montré que la plupart des souches (11/18 ; 61,1%) étaient du génotype 1 (VHD-1). Les sept autres souches se sont regroupées au sein du génotype 7 (**Figure 31**).

Une forte variabilité intragénotypique a été observée au sein de génotype 1 qui montre une répartition de ces 11 souches au sein de plusieurs clusters et avec une distance génétique moyenne de 10. De la même façon, les 7 souches du génotype 7 se sont réparties au sein de 4 clusters et la distance génétique moyenne de 18% a été retrouvée au sein de ce groupe.

Pour confirmer ces résultats obtenus, les séquences des génomes complets VHD de ces 18 souches ont été générées avec succès. L'analyse phylogénétique de ces séquences complètes a montré une concordance pour 15 souches dont 10 de génotype 1 et 5 de génotype 7. De façon inattendue et surprenante, 2 souches (Mebak58, Mebak25) qui étaient de génotype 7 dans la région R0 se sont retrouvées dans le cluster des génotypes 1 et la souche Bobak 95 qui était de génotype 1 en R0 s'est retrouvée dans le cluster des génotypes 7 (**Figure 32**). Ces résultats suggèrent que ces trois souches de VHD seraient des formes recombinantes.

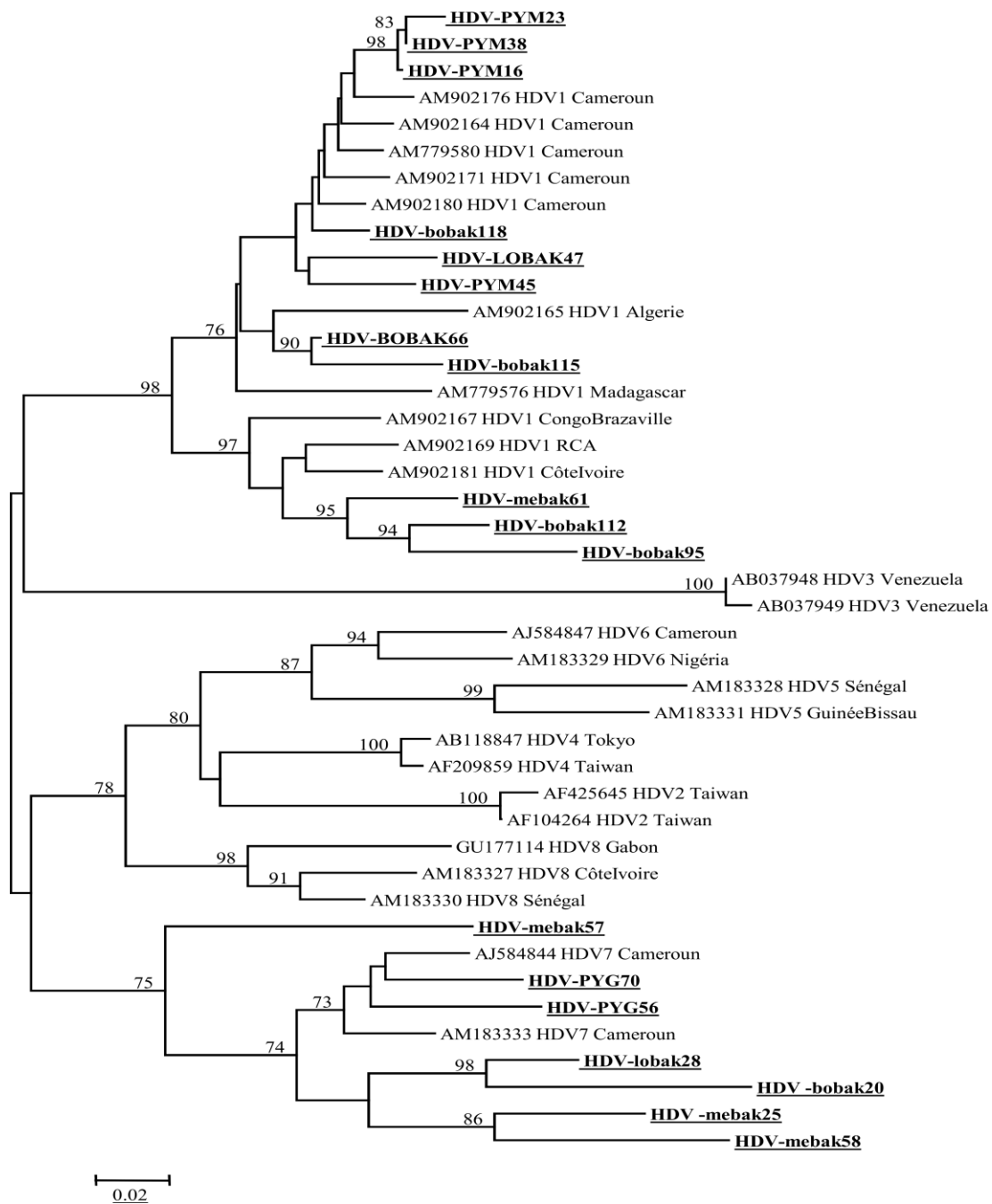


Figure 31 : Relation phylogénétique de VHD des pygmées au niveau de la région R0.

Phylogramme basé sur les séquences du gène sHD d'environ 360-bp suivant la méthode du plus proche voisin «Neighbor-joining». Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura two-parameter. Les 18 souches des Pygmées sont soulignées et en gras. Elles sont identifiées par HDV suivi du nom de l'ethnie et du numéro de l'individu. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont présentées devant les nœuds respectifs. La barre d'échelle indique la distance génétique en substitutions par site.

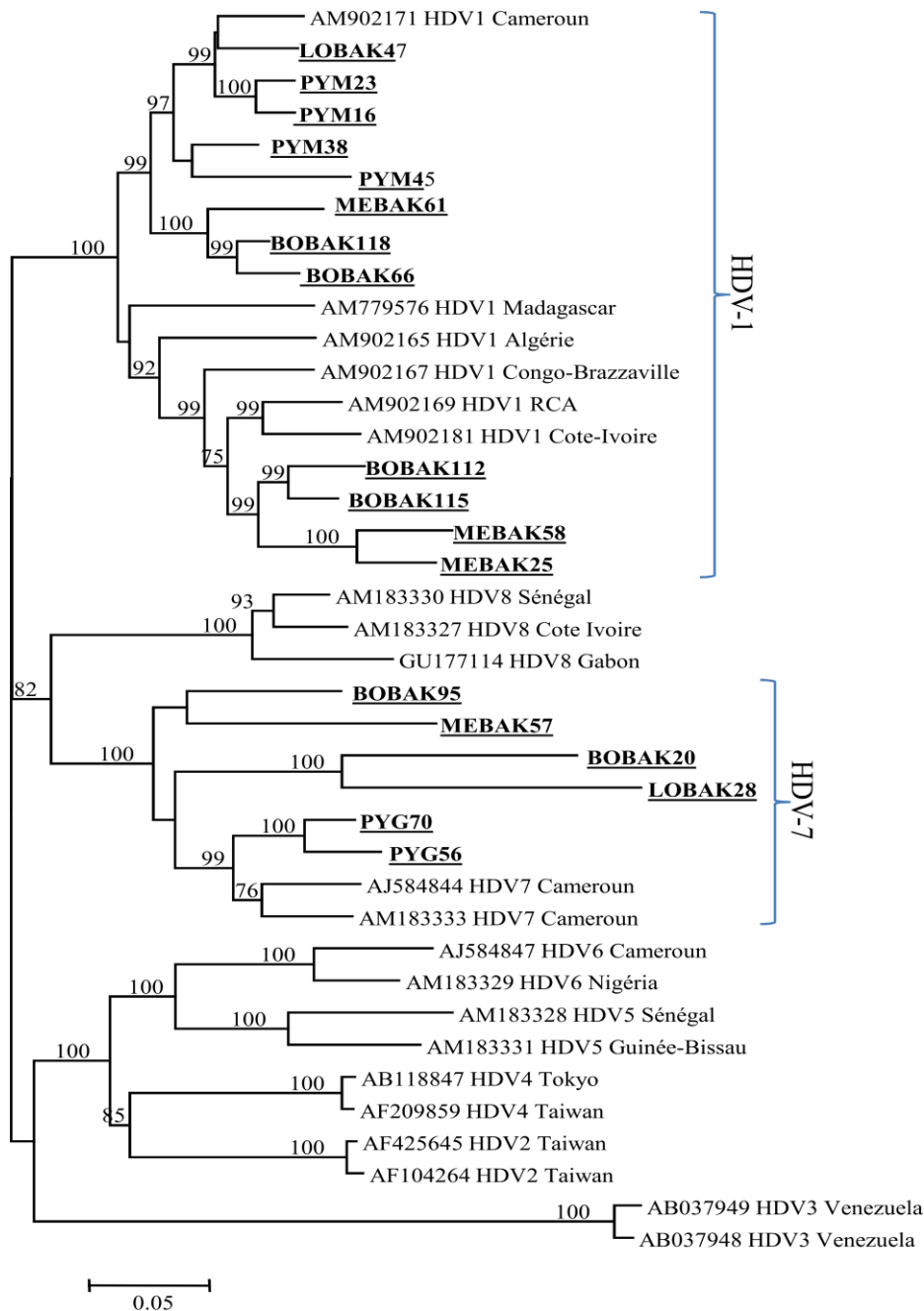


Figure 32 ; Relation phylogénétique de VHD des pygmées au niveau du génome complet.

Arbre phylogénétique construit sur la base des séquences des génomes complets 1680 pb suivant la méthode du plus proche voisin «Neighbor-joining ». Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura two-parameter. Les souches pygmées identifiées par le groupe ethnique suivi du numéro d'identification de l'individu sont en gras et soulignées. Les souches de référence sont présentées par leur code d'accès dans GENBANK suivi du génotype de VHD et du pays où la souche virale a été identifiée. La plupart des valeurs de bootstrap inférieures à 70% ont été omises. La barre d'échelle indique la distance génétique en substitutions par site de l'analyse.

III.1.3. Etude des mutations spécifiques des VHB chez les populations humaines du Cameroun

Les séquences des génomes complets du VHB obtenues chez les porteurs chroniques VHB (53 séquences) et les pygmées (10 séquences) ont été utilisées pour la recherche des mutations spécifiques permettant de mieux caractériser les souches de VHB circulants au sein de ces populations. Les mutations spécifiques recherchées comprenaient :

- Les mutations permettant de définir les sérotypes du VHB
- Les mutations Précore/core/BCP du VHB et statut de portage d'antigène d'enveloppe
- Les mutations d'échappement à la vaccination contre le VHB
- Les mutations de résistance au traitement antiviral
- Les mutations du gène X et relation avec le carcinome hépatocellulaire (CHC)

III.1.3.1. Les séquences d'acides aminés de la protéine M du VHB des porteurs chroniques VHB et les pygmées

La figure 33 présente les séquences d'acides aminés de la protéine majeure de l'antigène de surface et les positions qui permettent de définir les sérotypes.

III.1.3.2. Distribution des sérotypes du VHB au sein des populations des porteurs chroniques VHB et des pygmées

En référence au tableau 1 qui présente les différents sérotypes de VHB en fonction des acides aminés à des positions spécifiques, trois sérotypes *adw2*, *ayw1* et *ayw4* ont été identifiés au sein de la population humaine. Les 3 sérotypes ont été retrouvés chez les porteurs chroniques VHB ; tandis que chez les pygmées, seulement deux sérotypes *ayw1* et *ayw4* ont été identifiés (**Figure 34**). Dans cette dernière population, il est à noter que les sérotypes *ayw1* et *ayw4* sont associés respectivement aux génotypes A et E.

L'analyse de la fréquence de détection des sérotypes en fonction des génotypes du VHB au sein de la population humaine a montré que le sérotype *ayw1* était associé de façon significative ($p < 0,05$) au génotype A alors que le sérotype *ayw4* l'était significativement ($p < 0,05$) au génotype E (**Figure 35**)

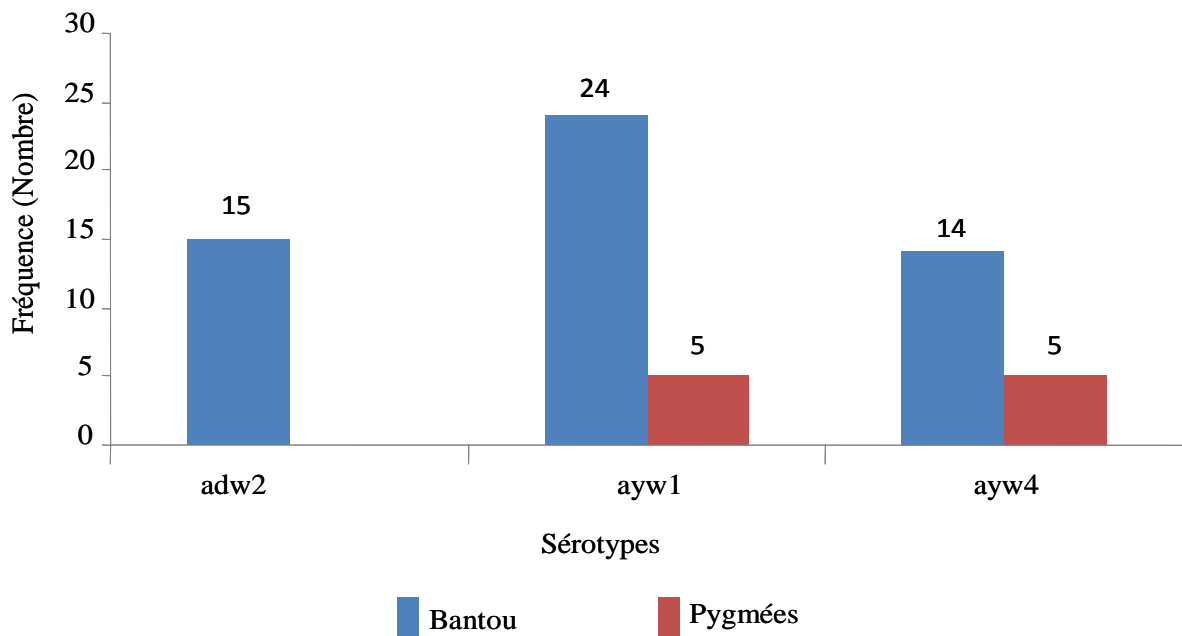


Figure 34: Fréquence de détection des sérotypes de VHB au sein des populations des porteurs chroniques VHB et des pygmées du Cameroun.

Les chiffres au-dessus de chaque histogramme représentent le nombre absolu de chaque sérotype au sein de la population étudiée.

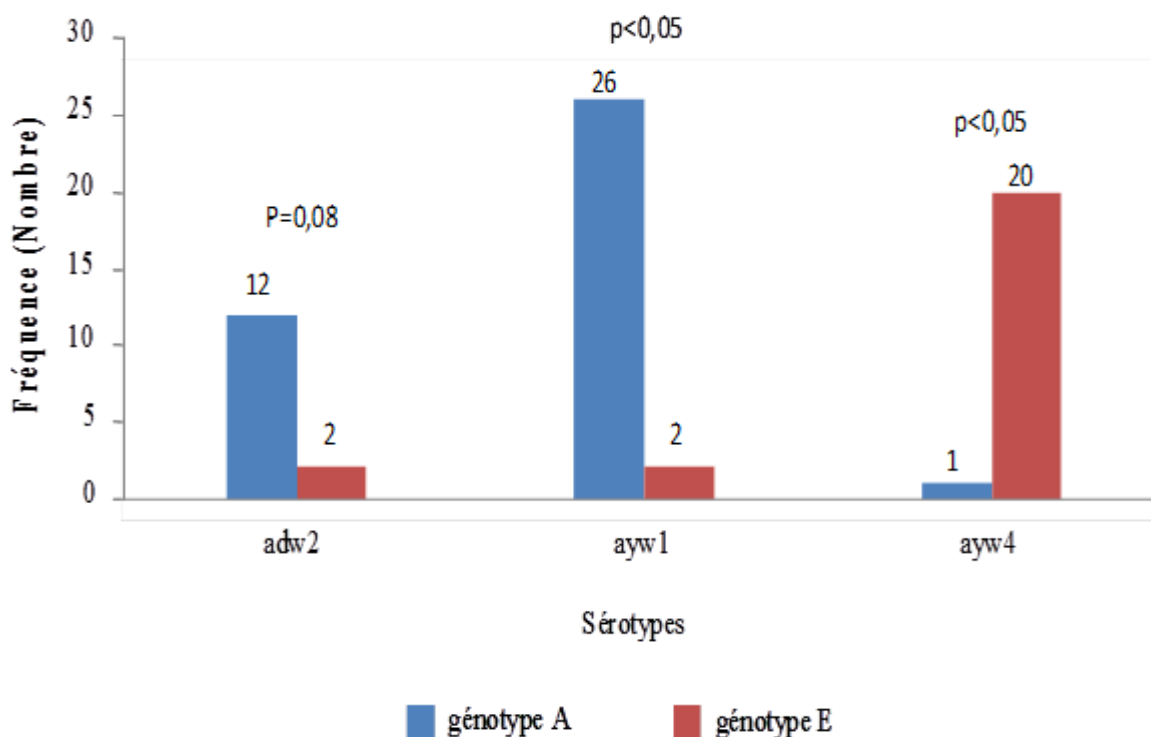


Figure 35 : Fréquence de détection des sérotypes de VHB en fonction des génotypes A et E du VHB.

Les chiffres au dessus de chaque histogramme représentent le nombre absolu de chaque sérotype au sein de la population étudiée. La valeur de p est aussi représentée au dessus de chaque groupe de sérotype.

III.1.3.3 Les séquences nucléotidiques Précore/core/BCP du VHB dans la population humaine du Cameroun

Dans l'objectif d'analyser les mutations Précore/core/BCP chez les porteurs chroniques VHB et les pygmées, les séquences des nucléotides spécifiques identifiés comme étant impliqués dans ces mutations ont été montrés sur les figures 36 et 37

	1 760	1761	1762	1763	1764	1 780	1 800
LEU(A)	CCTT	GAGGCTTACT	TCAAAGACTG	TGTGT - TT - A	AAGACTGGGA	- GGAGT	
ZAN(A)
NDN(A)	G
MNN(A)
EKA(A)	G	G	A
DJD(A)	G	A	A
BAN(A)
MES(A)	T	A
MEB58(A)
MBM(A)
BOB202(A)
EKO(A)
ALL(A)	C
PYM24(A)
ENA(A)	T	A
ATB(A)	C
LOB40(A)
MEB70(A)	T	A	G
KON(A)
DJU(A)	T	A
TIE(A)
EFF(A)	T	A	A
NAK(A)
KEN(A)	T	A
MET(A)	T	A	A
EDI(A)
TAK(A)	T	A
KAB(A)	TAA	C
YON(A)	T	A
NGF(A)	T	A
ANY(A)	T	A	C
MID(A)	C
NGK(A)	T	A	A
NGE(A)	C	T	A	A	G	A
ELE(A)	G
TIE(A)
MNT(A)	T	A
EGH(A)
NEN(A)	T	A	C
PYG58(E)	A	T	T
ASY(E)	A	T	T
ZEV(E)	A	T	T
PYG23(E)	A	T	T
PYG65(E)	A	T	T
PYG42(E)	C	A	T	T
NGU(E)	A	T	T
YOV(E)	A	T	T
TAS(E)	A	T	T
PYM38	A	T	T
NAD(E)	C	T	A	A	T	T
DAM(E)	T	A	A	T	T
BON(E)	A	T
TCH(E)	A	T	T
MBA(E)	C	T	A	A	T	T
ABD(E)	A	T
MAF(E)	T	A	A	T
MEK(E)	A	T	T
NDZ(E)	T	A	A	C	G
YAC(E)	A	A
CAT(E)	A	G
LAD(E)	C	A	T	T
NAB(E)	C	A	T
ASS(E)	T	G	A	A

Figure 36 : Séquences nucléotidiques du gène Précore du VHB des porteurs chroniques VHB et pygmées et les positions associées à des mutations ayant une conséquence clinique.

Les points représentent les nucléotides identiques. Les tirets représentent les délétions. Les différents génotypes A et E sont entre parenthèses devant les codes des patients respectifs. Les individus pygmées sont Pyg, pym, meb et lob. Les autres sont les porteurs chroniques de VHB

	G1896A					
LEU(A) T	GAGGCTTACT	TCAAAGACTG	TGTGT - TT - A	AAGACTGGGA	- GGAGTTGGC	
ZAN(A)
NDN(A)	. G
MNN(A)
EKA(A)
DJD(A) G
BAN(A)
MES(A)	. T . A
MEB58(A)
MBM(A)
BOB202(A)
EKO(A)
ALL(A)
PYM24(A)
ENA(A)	. T . A
ATB(A) C
LOB40(A)
MEB70(A)
KON(A)
DJU(A)	. T . A
TIE(A)
EFF(A)	. T . A
NAK(A)
KEN(A)	. T . A
MET(A)	. T . A
EDI(A)
TAK(A)	. T . A
KAB(A)	. T . A
YON(A)	. T . A
NGF(A)	. T . A
ANY(A)	. T . A . C
MID(A) C
NGK(A)	. T . A
NGE(A)	. T . A . A . . G
ELE(A) G
TIE(A)
MNT(A)	. T . A
EGH(A)
NEN(A)	. T . A . C
PYG58(E) A
ASY(E) A
ZEV(E) A
PYG23(E) A
PYG65(E) A
PYG42(E) A
NGU(E) A
YOV(E) A
TAS(E) A
PYM38 A
NAD(E)	. T . A . A
DAM(E)	. T . A . A
BON(E) A
TCH(E) A
MBA(E)	. T . A . A
ABD(E) A
MAF(E)	. T . A . A
MEK(E) A
NDZ(E)	. T . A . A C
YAC(E) A
CAT(E) A
LAD(E) A
NAB(E) A
ASS(E) G	. . A . . A

Figure 37 : Séquences nucléotidiques du gène BCP du VHB des porteurs chroniques VHB et pygmées et la position associée à la mutation ayant une conséquence clinique.

Les points représentent les nucléotides identiques. Les tirets représentent les insertions/délétions. Les différents génotypes A et E sont entre représentés entre parenthèses devant les codes des patients respectifs.

III.1.3.4. Distribution des mutations Précore/core/BCP dans les populations des porteurs chroniques VHB et pygmées du Cameroun

Les mutations BCP (Basal core promoter) ou PBC en Français (promoteur basal du core) sont étudiées en identifiant les mutations survenues sur les positions 1762-1764 dont le codon sauvage est AGG. Ces mutations ont été étudiées pour les 63 séquences des génomes complets (porteurs chroniques VHB et pygmées). Les fréquences de détection de ces mutations sont consignées sur la **Figure 36**. De façon globale la double mutation A1762T/G1764A est la mutation majoritairement rencontrée dans les deux populations humaines. L'analyse de la fréquence de détection de cette mutation en fonction des génotypes A et E du VHB a montré que cette double mutation a été majoritairement présente dans les souches de génotype A comparées aux souches de génotype E (**Figure 38**). Mais, toutefois cette différence n'est pas statistiquement significative ($p = 0.28$).

La mutation précore/core la plus étudiée est celle décrivant la substitution du nucléotide G par le nucléotide A à la position 1896 (G1896A). Sur 63 génomes complets de VHB humains, cette mutation a été observée chez 5 (7,9%) individus dont 4 (7,5%) chez les porteurs chroniques VHB et 1 (10%) chez les Pygmées. cette observation n'a pas été statistiquement significative d'une population à l'autre ($p = 0.65$).

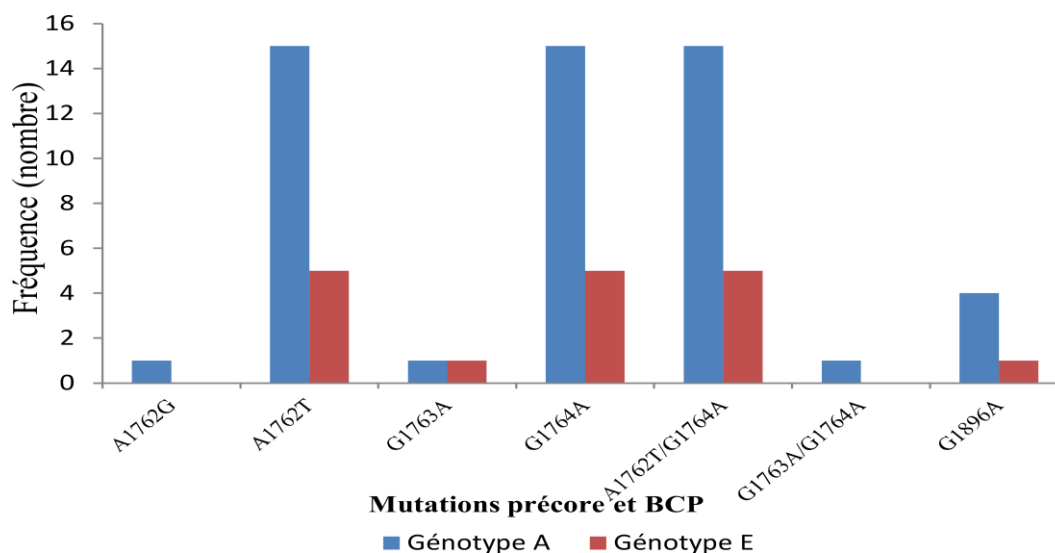


Figure 38 : Fréquence de détection des différentes mutations du précore/Core et du promoteur basal du Core en fonction des génotypes A et E du VHB.

III.1.3.5. Mutations précore/core/BCP et production d'AgHBe du VHB

Des études ont bien démontrées une corrélation entre la mutation précore/core/BCP et le niveau de production de l'AgHBe (Baptista *et al.*, 1999; Brunetto *et al.*, 1993). Dans notre travail, la présence de l'AgHBe a été recherchée dans les 233 échantillons des porteurs chroniques VHB. L'AgHBe a été détecté dans 25/233 (10,7%) échantillons.

La quantification de l'ADN du VHB (ou charge virale VHB) dans les 233 échantillons AgHBs positifs a montré des charges virales VHB significativement plus élevées au sein des 25 échantillons AgHBe positifs comparés aux 208 échantillons AgHBe négatifs ($p < 0,05$) (**Figure 39**).

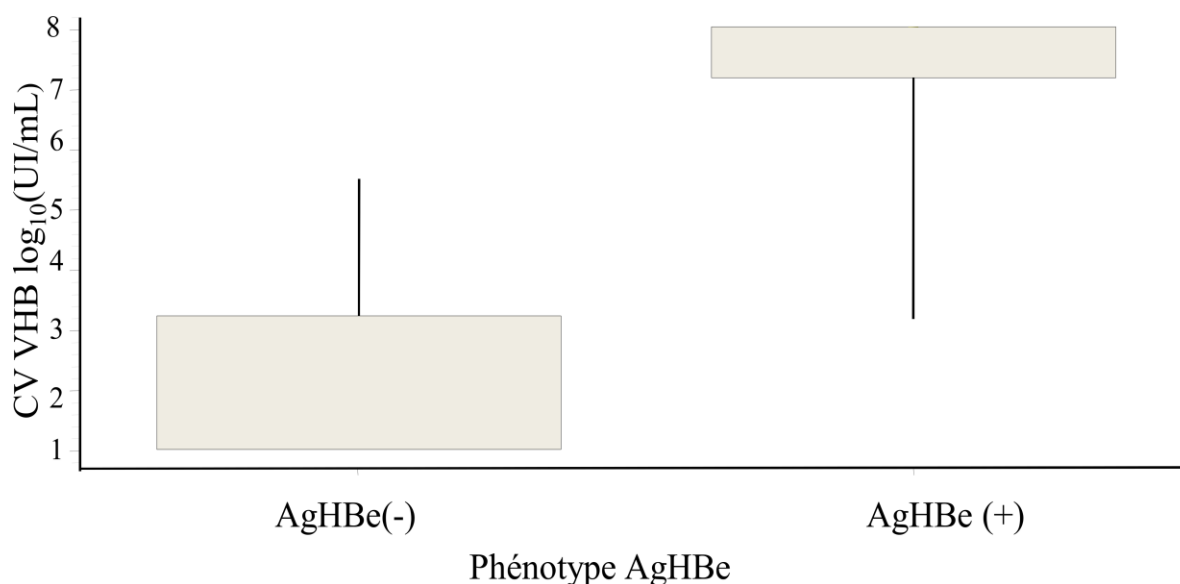


Figure 39 : Distribution des valeurs de Charges virales VHB en fonction du phénotype AgHBe.

Dans le but d'étudier la corrélation entre la présence des mutations précore/core/BCP et la production ou non de l'AgHBe, 53 souches pour lesquelles nous avons obtenu des séquences complètes de VHB et des données de l'AgHBe au sein de la population des porteurs chroniques VHB ont été étudiées.

Parmi les 53 échantillons analysés, 4 (7,5%) ont présenté une mutation au niveau du précore/core (G1896A). Cette mutation est associée à la non production de l'AgHBe pour les quatre patients.

Un total de 9/53 (17%) échantillons ont présenté une mutation au niveau du BCP (A1762G ou G1763A ou G1764A). Il faut rappeler que les mutations A1762G et G1763A sont associées à la production d'AgHBe, tandis que la mutation G1764A est associée à la non production d'AgHBe. En plus, 20 (37,7%) échantillons ont présenté des doubles mutations dans le PBC parmi lesquelles 15 sont associées à la non production de l'AgHBe.

La **Figure 40** montre la fréquence de détection des mutations précore/core/BCP en fonction du statut AgHBe. La **Figure 40** montre bien que la non production de l'AgHBe est significativement associée à la présence des mutations G1764A dans la région BCP et G1896A dans la région précore/core.

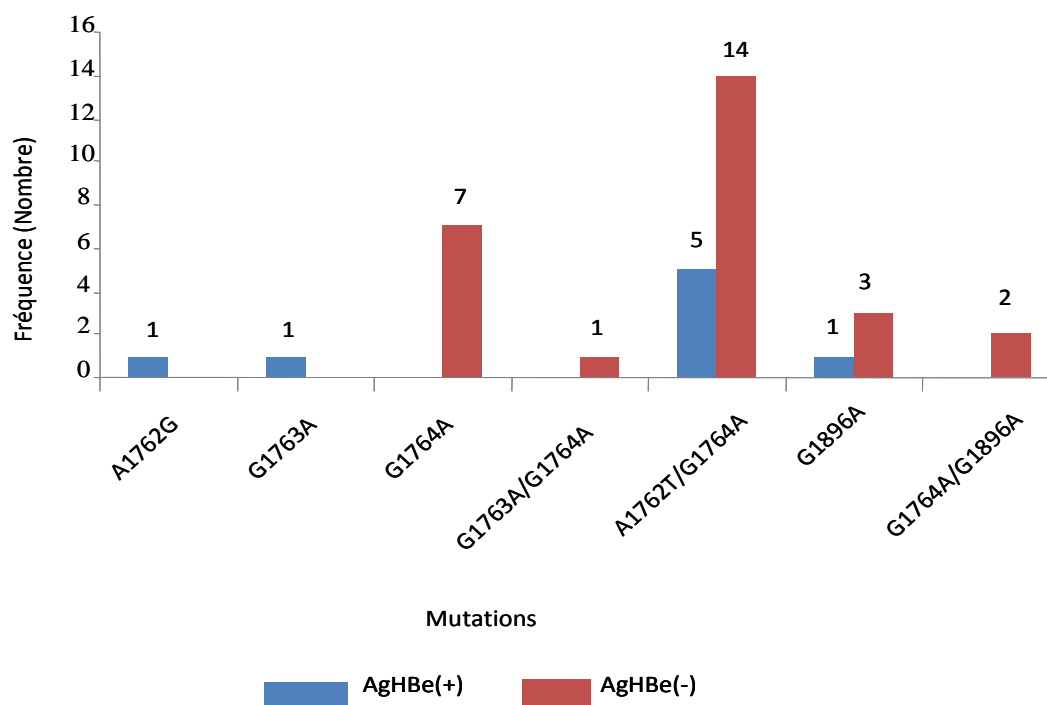


Figure 40 : Fréquence de détection des mutations précore/core/BCP en fonction du statut AgHBe.

III.1.3.6. Mutations précore/core/BCP et développement du carcinome hépatocellulaire

Les mutations nucléotidiques C1653T, T1753/C/A/G et la double mutation A1762T/G1764A ont été reportées comme un facteur de risque de développement du carcinome hépatocellulaire (Sirma *et al.*, 1999; Stemler *et al.*, 1990). En plus des mutations BCP et précoces qui affectent la protéine X, d'autres mutations ont été encore identifiées dans la protéine X comme étant associées au CHC : T1464G (Yeh, 2000) et C1485T (Muroyama *et al.*, 2006) La fréquence de détection de la double mutation A1762T/G1764A a déjà été présentée dans le paragraphe précédent. Aucune souche n'a présenté de mutation pour les positions suivantes C1653T, T1753V, T1464G et C1485T.

III.1.3.7. Les mutations d'échappement à la vaccination contre le VHB

En référence aux mutations d'échappement à la vaccination et au diagnostic du VHB (paragraphe **I.5.2.2**), aucune de ces mutations décrites n'a été identifiée dans notre population humaine.

III.1.3.8. Les mutations de résistance au traitement antiviral

En référence aux mutations d'échappement à la vaccination et au diagnostic du VHB (paragraphe **I.5.2.6**), aucune de ces mutations décrites n'a été identifiée dans notre population humaine.

III.1.3.9. Les mutations du gène X et le carcinome hépatocellulaire (CHC)

Les changements des acides aminés aux positions HBx5, HBx38, HBx94, HBx130 et HBx131 constituent un facteur prédictif de l'évolution de la maladie vers le carcinome hépatocellulaire (Sirma *et al.*, 1999; Stemler *et al.*, 1990).

Dans le but de rechercher ces mutations au niveau du gène X du VHB, 53 souches pour lesquelles nous avons obtenu des séquences complètes de VHB au sein de la population des porteurs chroniques VHB été étudiées.

Parmi les 53 échantillons analysés, aucune souche n'a présenté les mutations HBx5, HBx38, HBx94. Mais par contre, une seule souche de génotype A a montré un changement à la position HBx130

III.1.3.10. Recherche des recombinaisons génétiques entre les souches de VHB des différentes populations étudiées.

Dans le but de rechercher les recombinaisons génétiques entre les souches de VHB du Cameroun, nous avons analysé les génomes complets des souches obtenues dans notre étude. Au total 69 génomes complets du VHB ont été étudiés. Parmi eux 53 provenaient des porteurs chroniques VHB, 10 des populations Pygmées, 3 PNH de l'espèce gorille, 2 des PNH de l'espèce chimpanzés et 1 d'un petit singe de la famille des *Cercopithecidae*. Pour ce faire, le génome du VHB a été linéarisé en suivant la recommandation du comité international de taxonomie virale qui propose que le premier gène soit le gène S (Pré-S2 et S), suivi du gène X, du gène C et enfin du gène Pré-S1. Cette linéarisation confère donc les positions suivantes aux gènes : Pré-S2 (1-55), S (155-832) ; X (1374-1838) ; C (1814-2458) et Pré-S1 (2854-3221). La position 1 correspond au site de coupure par l'enzyme de restriction EcoR1. Dans notre approche de recherche de recombinaison, chaque génome complet a été coupé en trois fragments subgénomiques et chacun des fragments subgénomiques a été analysé séparément. En cas d'identification des génotypes différents après comparaison des résultats obtenus à l'issue de l'analyse au niveau des trois fragments, la confirmation de la présence de la recombinaison génétique a été recherchée à l'aide de la méthode de Bootscan / Simplot.

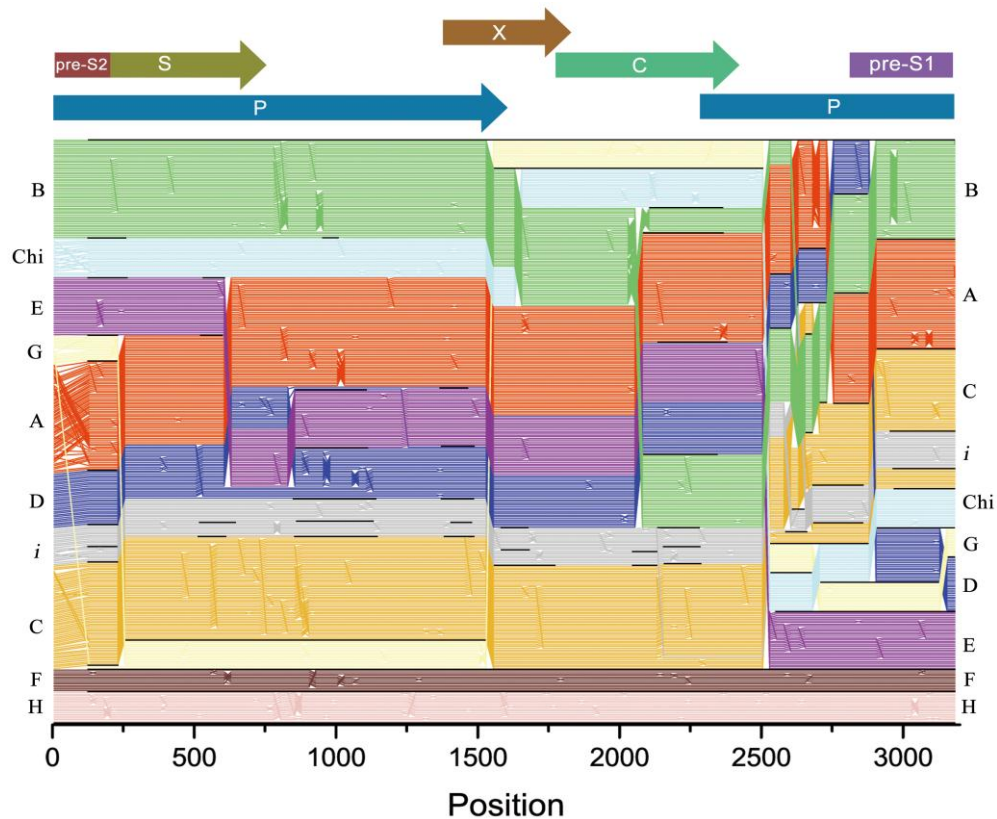


Figure 41 : Linéarisation des souches non recombinantes du VHB. Adapté de (Hai Y et al, 2010).

a). Recherche des recombinaisons génétiques de VHB chez les pygmées

Parmi les dix séquences de génomes complets identifiés chez les pygmées, aucune n'a montré un phénomène de recombinaison au niveau des arbres construits avec les fragments des gènes S, X et C (**Figure 42**).

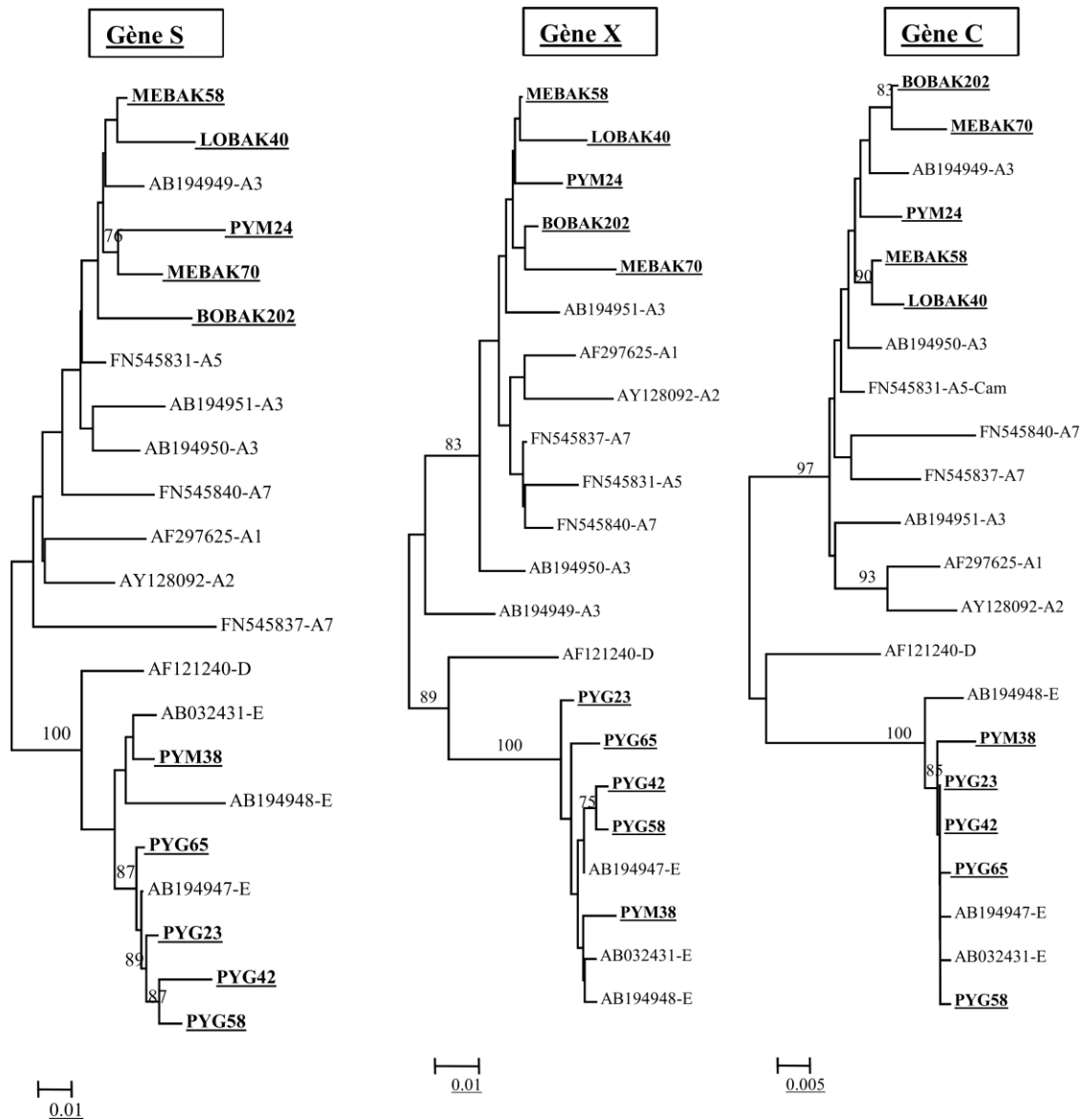


Figure 42 : Relations phylogénétiques entre les séquences nucléotidiques des VHB des pygmées et les séquences de référence du VHB au niveau des fragments subgénomiques S, X et C.

Les arbres ont été générés en utilisant la méthode du « plus proche voisin ». Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura- parameter's. Les souches des pygmées sont en gras et soulignées. Seules valeurs de Bootstrap > 70 ont été présentées.

b). Recherche des recombinaisons génétiques de VHB chez les porteurs chroniques VHB

Un total de 7/53 (13,2%) des souches de VHB identifiées chez les porteurs chroniques VHB ont présenté des recombinaisons génétiques de type A/E chez des souches **NDZ, ABD, MAF, BON, YAC, ASS et NAB (Figure 43)**

Dans le but de confirmer les recombinaisons génétiques obtenues ci-dessus, chacune des 7 souches de VHB ayant donné des génotypes différents après analyse phylogénétique de chacun des 3 fragments subgénomiques a été analysée sur le logiciel SIMPLOT/BOTSCAN. De façon globale les 7 souches présentant les recombinaisons ont été confirmées et les 4 profils de recombinaisons ci-dessous ont été identifiés comme le montre les différentes figures présentant les pourcentages d'arbres permutés et les scores de similarité (**Figure 43, 44, 45, 46**).

-Profil 1 : génotype E dans les fragments des gènes Pré S, S et X, puis génotype A dans le fragment des gènes C pour les souches **ABD, MAF et BON (Figure 43)**

- Profil 2 : génotype E dans les fragments des gènes Pré S1 et X, génotype A dans les fragments des gènes Pré S2, S et C pour la souche **NDZ et Yac (Figure 44)**.

- Profil 3 : génotype E dans les fragments de gènes Pré S1, Pré S2, une partie de S et le gène X, génotype A dans une partie de S et le fragment du gène C pour la souche **ASS (Figure 45)**.

- Profil 4 : génotype E dans les fragments Pré S1, Pré S2, S et C, génotype E dans le fragment X pour la souche **NAB (Figure 46)**.

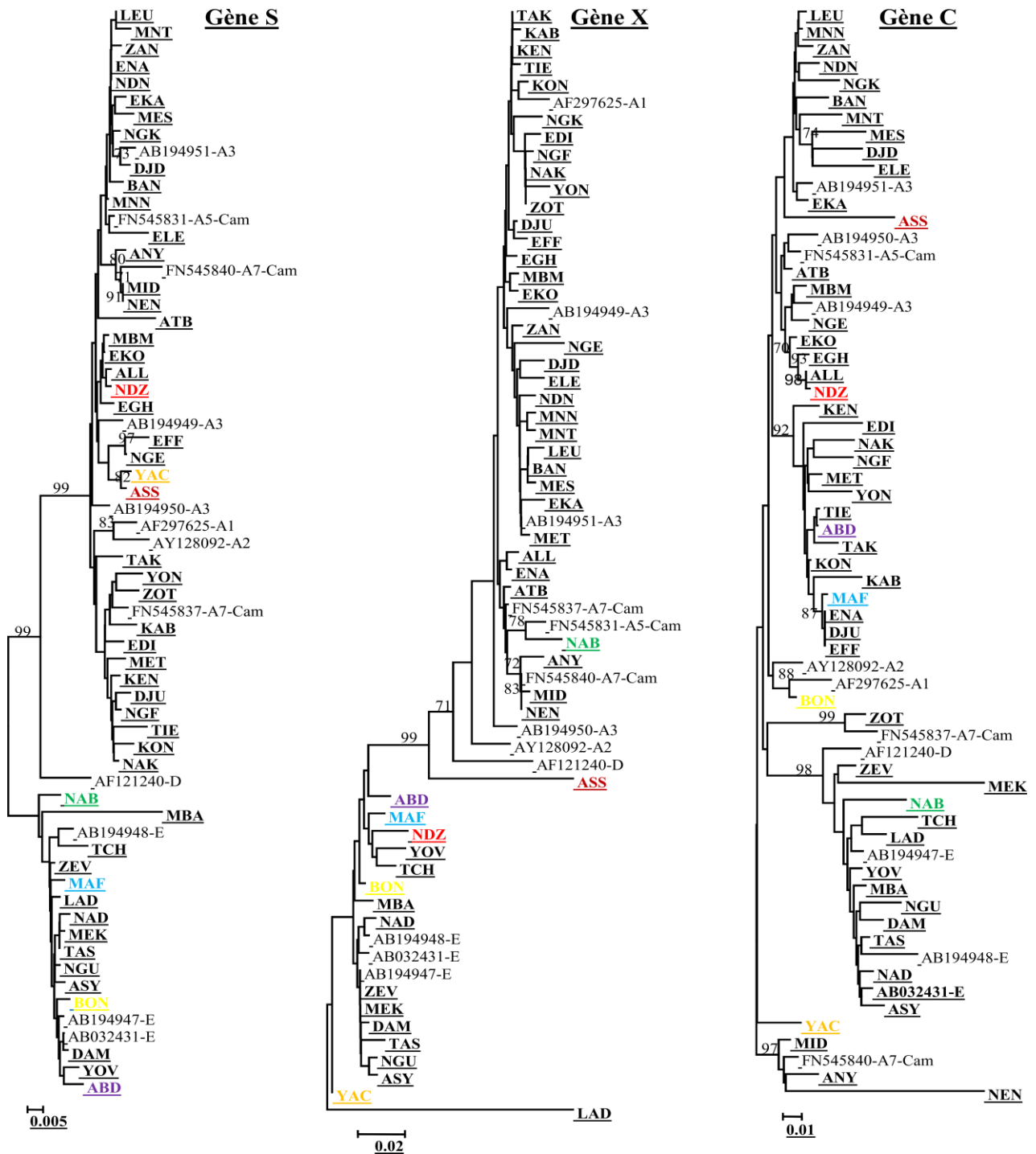


Figure 43: Relations phylogénétiques des VHB des porteurs chroniques VHB au niveau des fragments subgénomiques S, X et C.

Les arbres ont été générés en utilisant la méthode du « plus proche voisin ». Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura- parameter's. Les souches des porteurs chroniques VHB sont en gras et soulignées. Les souches présentant les résultats différents au niveau des fragments sont représentées par une couleur chacune. Seules valeurs de Bostrap > 70 ont été présentées.

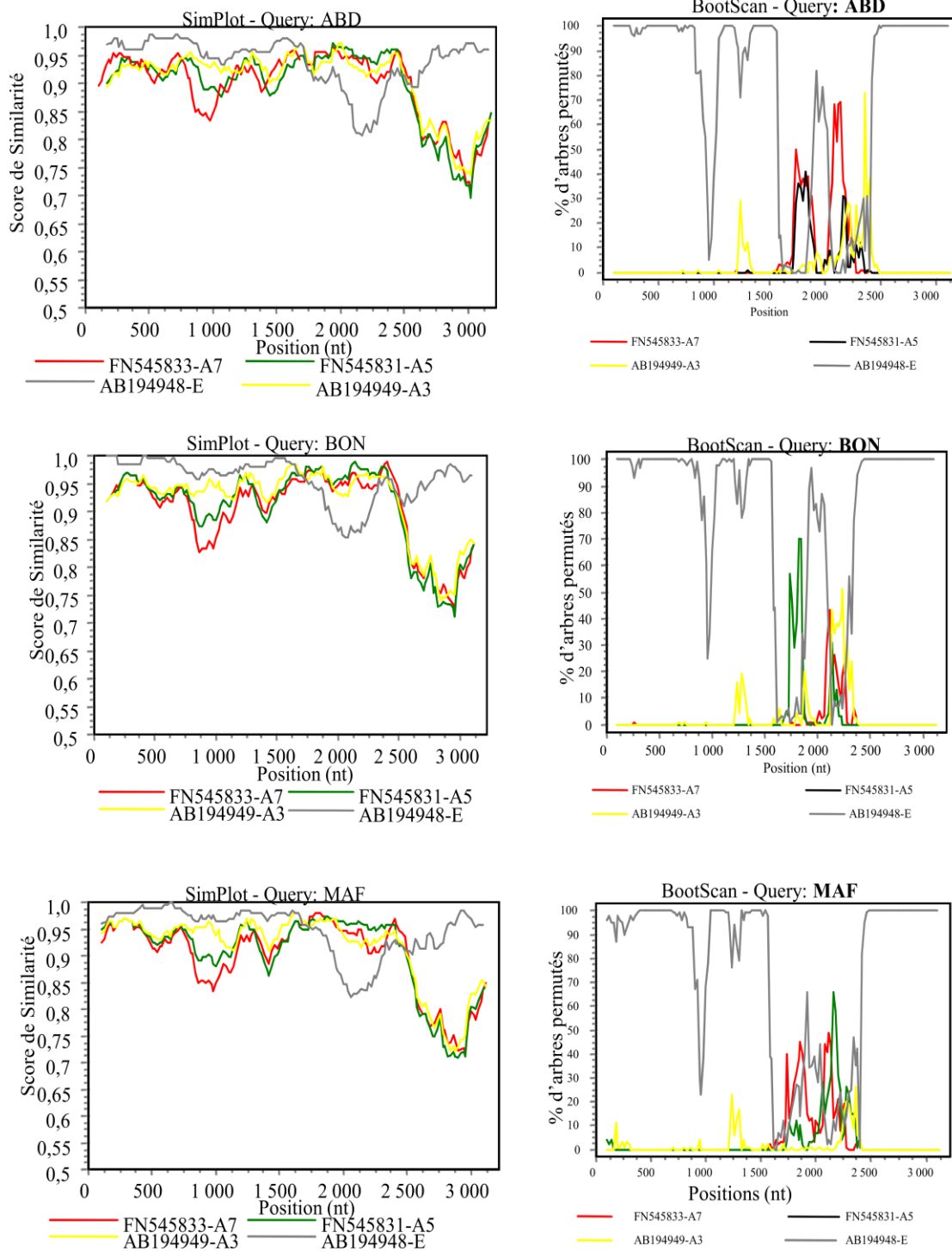


Figure 44 : Pourcentage d'arbres permutés et score de similarité (Simplot) des souches ABD, BON, MAF.

Les pourcentages d'arbres permutés (BOTSCAN) et les courbes de similarité (SIMPLOT) ont été générés en utilisant des fenêtres de 200 nucléotides (nt), des incréments de 20 nt, le modèle « Kimura 2- parameter », et un ratio de transition-transversion (Ts/Tv) de 10.

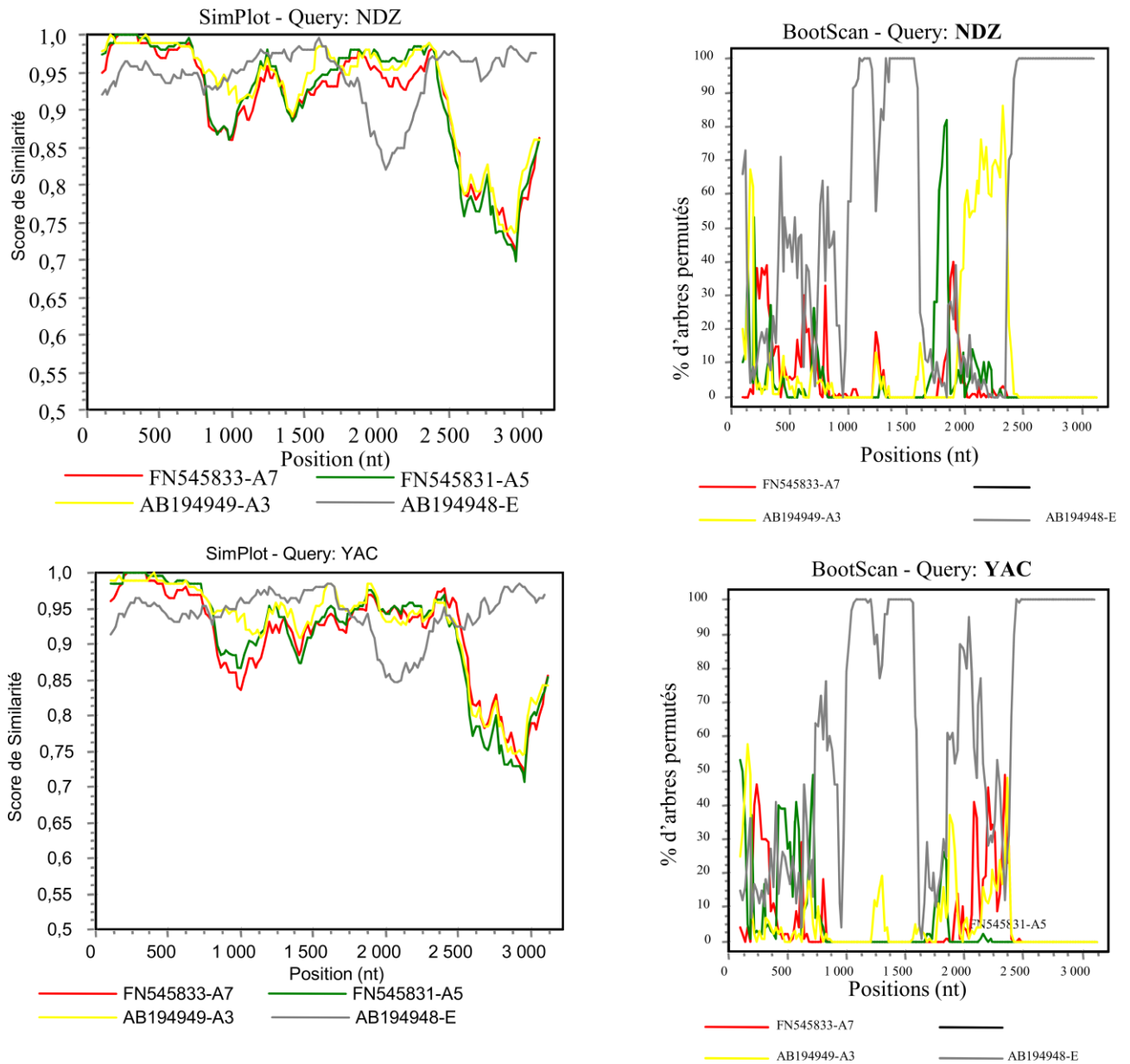


Figure 45 : Score de similarité (Simplot) et pourcentage d'arbres permutés (Bootscan) des souches NDZ et YAC.

Les pourcentages d'arbres permutés (BOTSCAN) et les courbes de similarité (SIMPLOT) ont été générés en utilisant des fenêtres de 200 nucléotides (nt), des incréments de 20 nt, le modèle « Kimura 2- parameter », et un ratio de transition-transversion (Ts/Tv) de 10.

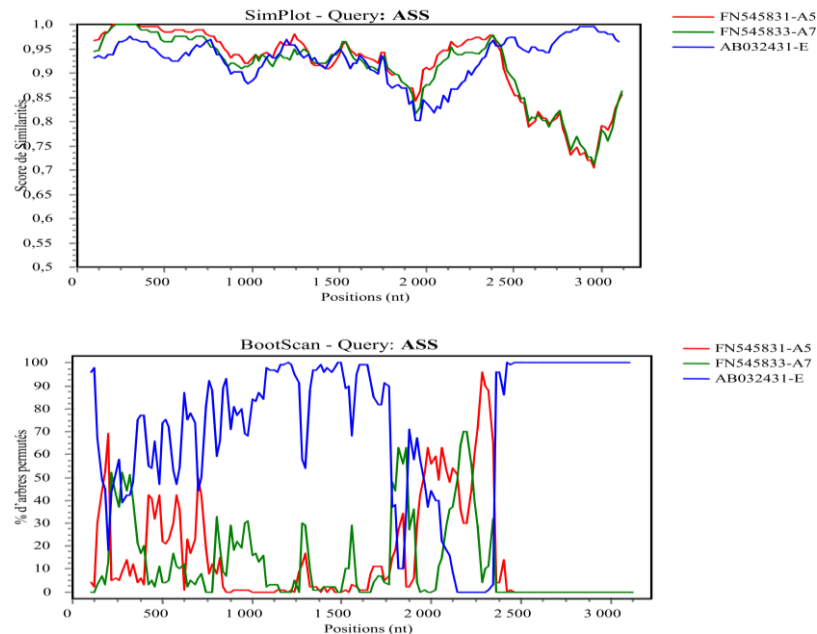


Figure 46 : Score de similarité (Simplot) et pourcentage d'arbres permutés (Bootscan) des souches ASS.

Les pourcentages d'arbres permutés (BOTSCAN) et les courbes de similarité (SIMPLOT) ont été générés en utilisant des fenêtres de 200 nucléotides (nt), des incréments de 20 nt, le modèle « Kimura 2- parameter », et un ratio de transition-transversion (Ts/Tv) de 10.

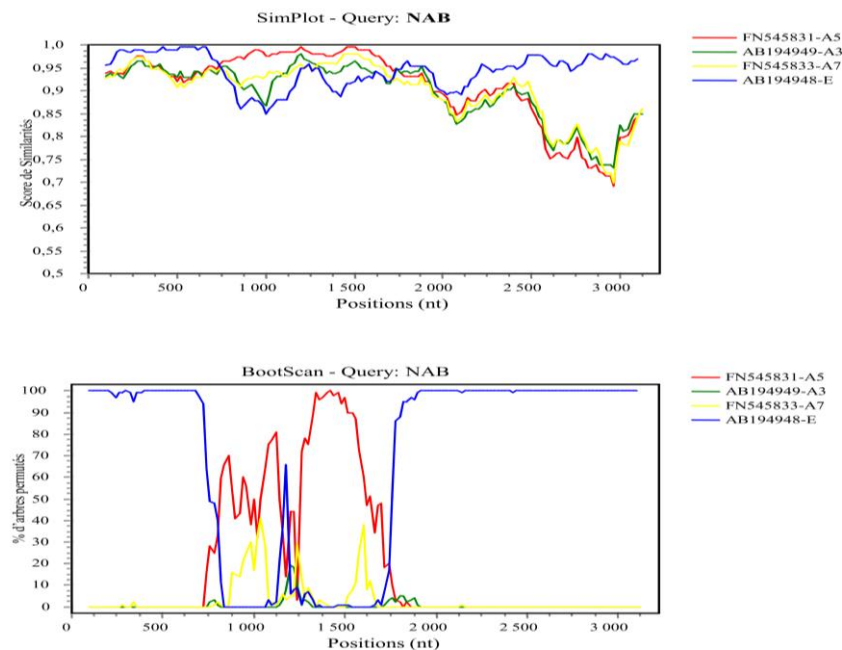


Figure 47: Score de similarité (Simplot) et pourcentage d'arbres permutés (Bootscan) des souches NAB.

Les pourcentages d'arbres permutés (BOTSCAN) et les courbes de similarité (SIMPLOT) ont été générés en utilisant des fenêtres de 200 nucléotides (nt), des incréments de 20 nt, le modèle « Kimura 2- parameter », et un ratio de transition-transversion (Ts/Tv) de 10.

c). Recherche des recombinaisons génétiques de VHB chez les grands singes

Chez les grands singes, trois séquences de génomes complets VHB de gorilles (ggcam 19, ggcam 7, ggcam 22) et deux séquences de génomes complets VHB de chimpanzés (cpzcam 17, cpzcam6) ont été utilisées pour la recherche des recombinaisons génétiques. Pour cela, les arbres phylogénétiques ont été construits au niveau de 3 fragments subgénomiques S, X et C.

L'analyse phylogénétique des trois arbres obtenus pour les trois fragments (**Figure 47**) a montré que les trois souches de Gorilles se sont regroupées entre elles au sein d'un seul phylon. Elles n'ont par conséquent pas présenté un éventuel phénomène de recombinaison génétique. Ces observations ont été confirmées par la méthode de BOTSCAN et SIMPLOT (Figure non présentées).

Par contre, les deux séquences complètes de chimpanzés ont montré des phénomènes de recombinaison génétique entre les VHB de la sous-espèce de chimpanzé pan *troglodyte troglodyte* et les VHB de la sous espèce de chimpanzé pan *troglodytes vellerosus*. En effet, les arbres phylogénétiques obtenus au niveau des trois fragments S, X et C ont montré que la souche cpzcam6 avait une séquence de la sous espèce pan *troglodyte vellerosus* au niveau des fragments S et X et une séquence de la sous espèce pan *troglodyte troglodyte* au niveau du fragment C. La souche cpzcam17 quand à elle, avait une séquence de la sous espèce pan *troglodyte troglodyte* au niveau des fragments S et X et une séquence de la sous espèce pan *troglodyte vellerosus* au niveau du fragment C (**Figure 47**).

Dans le but de confirmer les recombinaisons génétiques obtenues ci-dessus, chacune des 2 souches de VHB de Chimpanzés ayant donné des génotypes différents après analyse phylogénétique de chacun des 3 fragments subgénomiques a été analysée avec le logiciel SIMPLOT/BOTSCAN. De façon globale les trois profils de recombinaison ont été confirmés comme le montrent les différentes figures présentant les pourcentages d'arbres permutés et les scores de similarité (**Figure 48**).

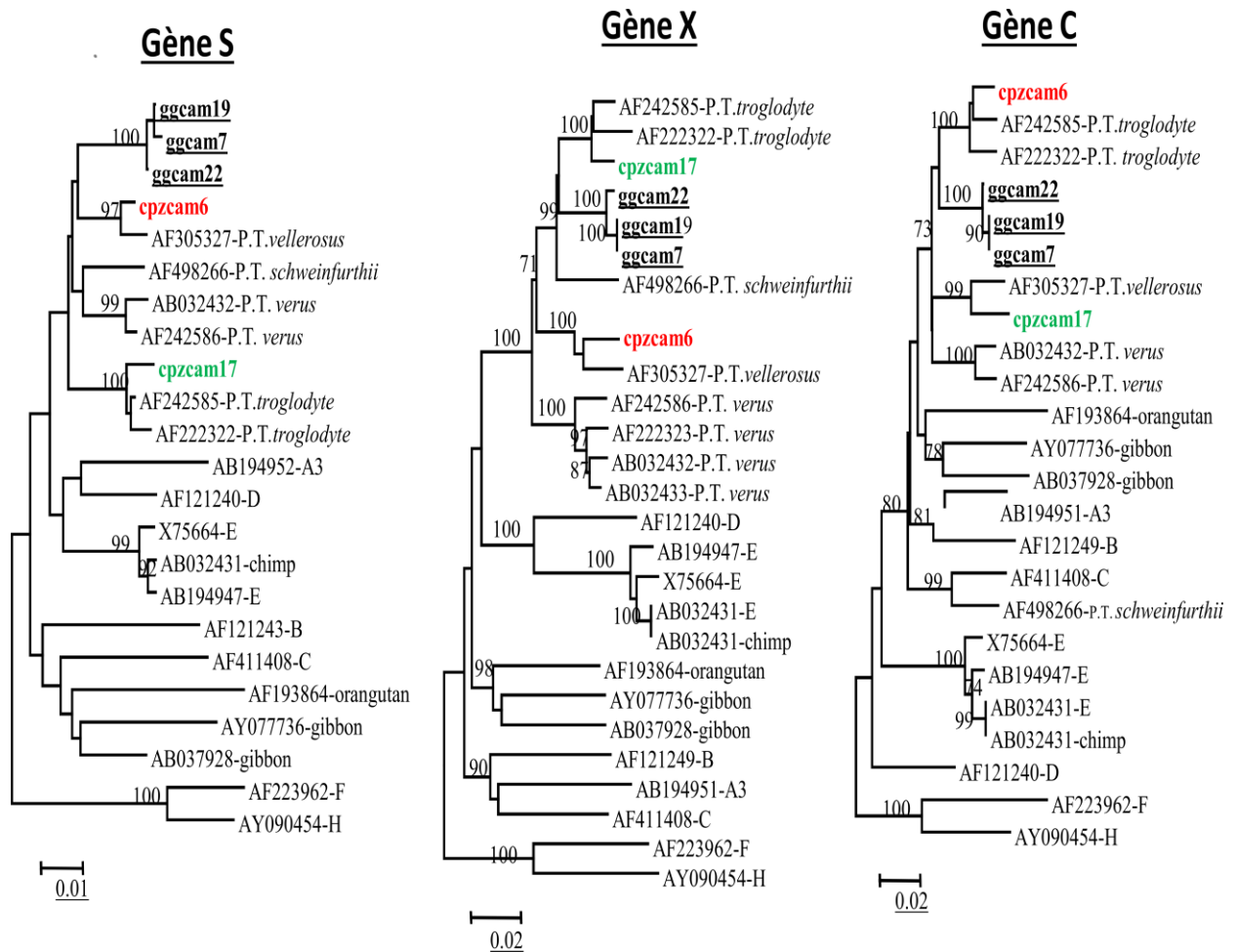


Figure 48 : Relations phylogénétiques des VHB des grands singes au niveau des fragments subgénomiques S, X et C.

Les arbres ont été générés en utilisant la méthode du « plus proche voisin ». Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura- parameter's. Les souches des grands singes sont en gras et soulignées. Les souches présentant les résultats différents au niveau des fragments sont représentées par une couleur. Seules valeurs de Bootstrap > 70 ont été présentées.

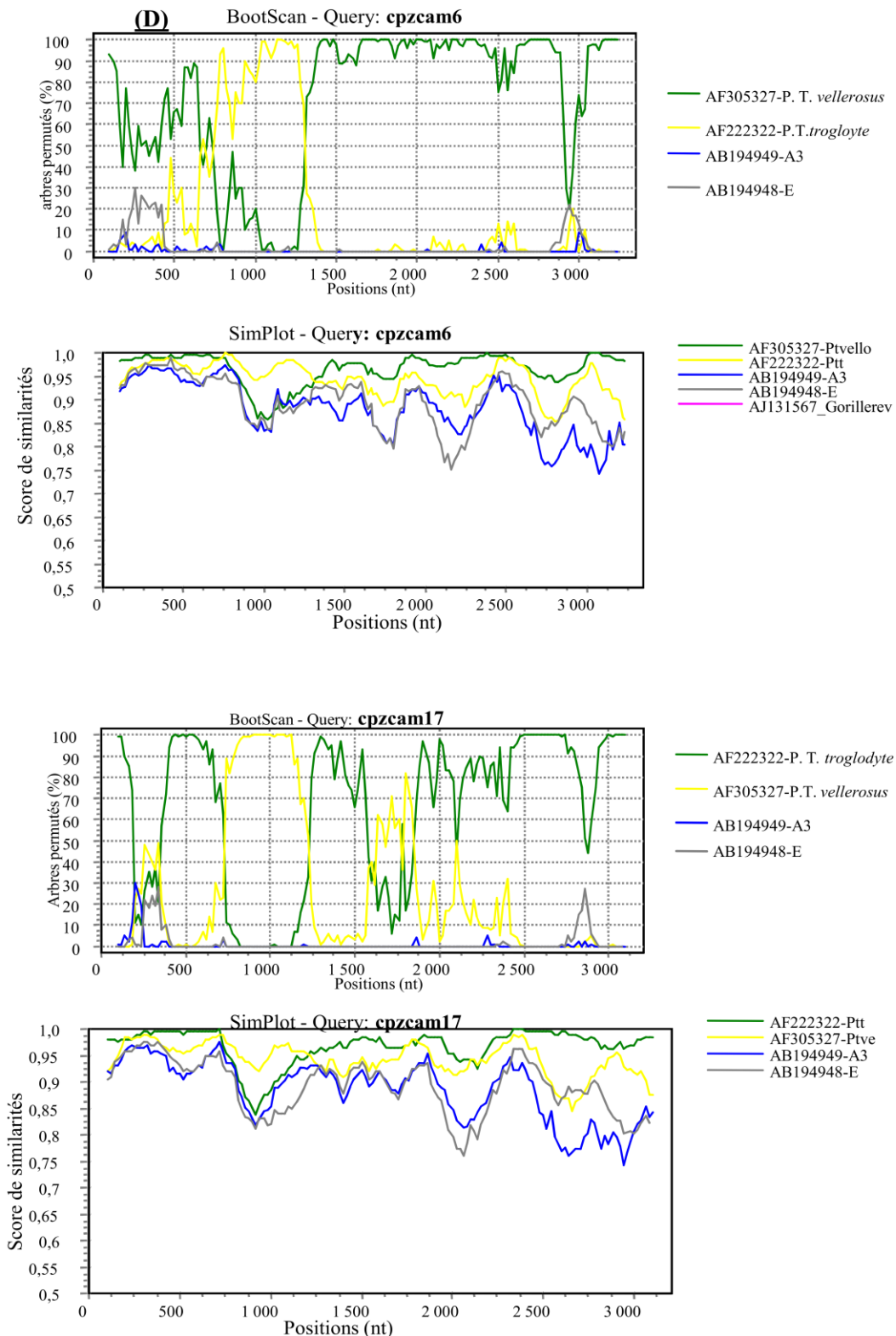


Figure 49 : Pourcentage d'arbres permutés et score de similarité des souches présentant la recombinaison chez les chimpanzés.

Les pourcentages d'arbres permutés (BOTSCAN) et les courbes de similarité (SIMPLOT) ont été générés en utilisant des fenêtres de 200 nucléotides (nt), des incréments de 20 nt, le modèle « Kimura 2- parameter », et un ratio de transition-transversion (Ts/Tv) de 10.

d). Recherche des recombinaisons génétiques de VHB chez les petits singes

La recherche des recombinaisons génétiques chez les petits singes a été réalisée seulement avec la seule souche du petit singe d'AKUM pour lequel nous avons pu obtenir le génome complet du VHB. Pour cela, les arbres phylogénétiques ont été construits au niveau de 3 fragments subgénomiques S, X et C.

L'analyse phylogénétique des trois arbres obtenus pour les trois fragments (**Figure 49**) a montré un éventuel phénomène de recombinaison génétique. En effet la séquence de la souche d'AKUM s'est regroupée avec les séquences VHB identifiées chez le chimpanzé de la sous-espèce *Pan troglodyte vellerosus* au niveau des fragments S et X et avec celles du VHB identifié chez le chimpanzé de la sous espèce *Pan troglodyte troglodyte* au niveau du fragment C.

Dans le but de confirmer la recombinaison génétique obtenue ci-dessus, cette souche de VHB du petit singe AKUM a été analysée avec le logiciel SIMPLOT/BOTSCAN. Le profil de recombinaison a été confirmé comme le montre la figure présentant les pourcentages d'arbres permutés et les scores de similarité (**Figure 50**).

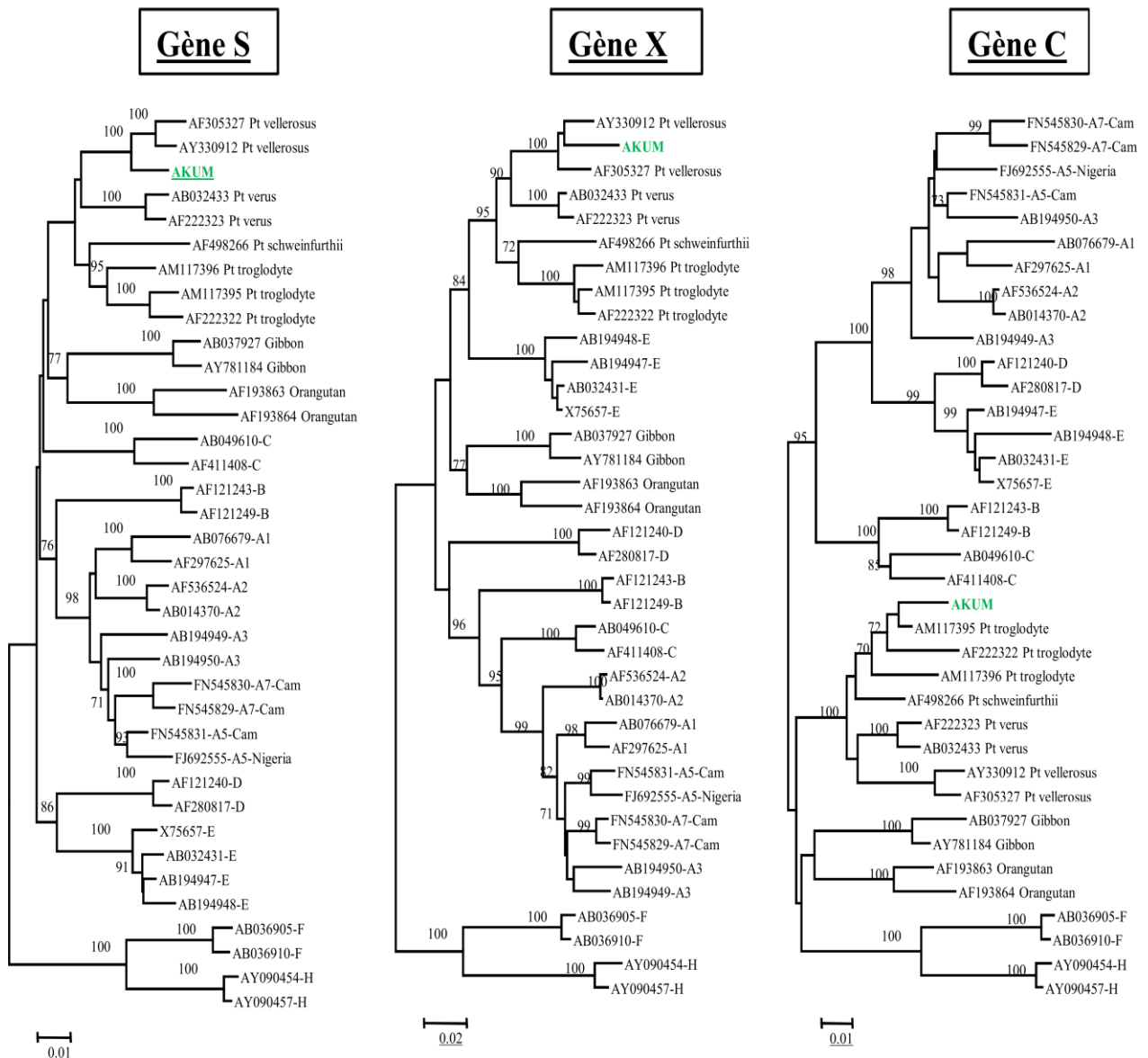


Figure 50 : Relations phylogénétiques entre les séquences nucléotidiques des VHB du petit singe AKUM et les séquences de référence du VHB au niveau des fragments subgénomiques S, C et X.

Les arbres ont été générés en utilisant la méthode du « plus proche voisin ». Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura- parameter's. Gène S (position 155-832) ; Gène X (Position 1374-1838) ; Gène C (Position 1814-2458). Les souches des porteurs chroniques VHB sont en gras et soulignées. Les souches présentant des discordances ont été représentées chacune par une couleur. Ce qui permet de lire facilement les discordances d'un arbre à l'autre. Seules valeurs de Bootstrap > 70 ont été présentées.

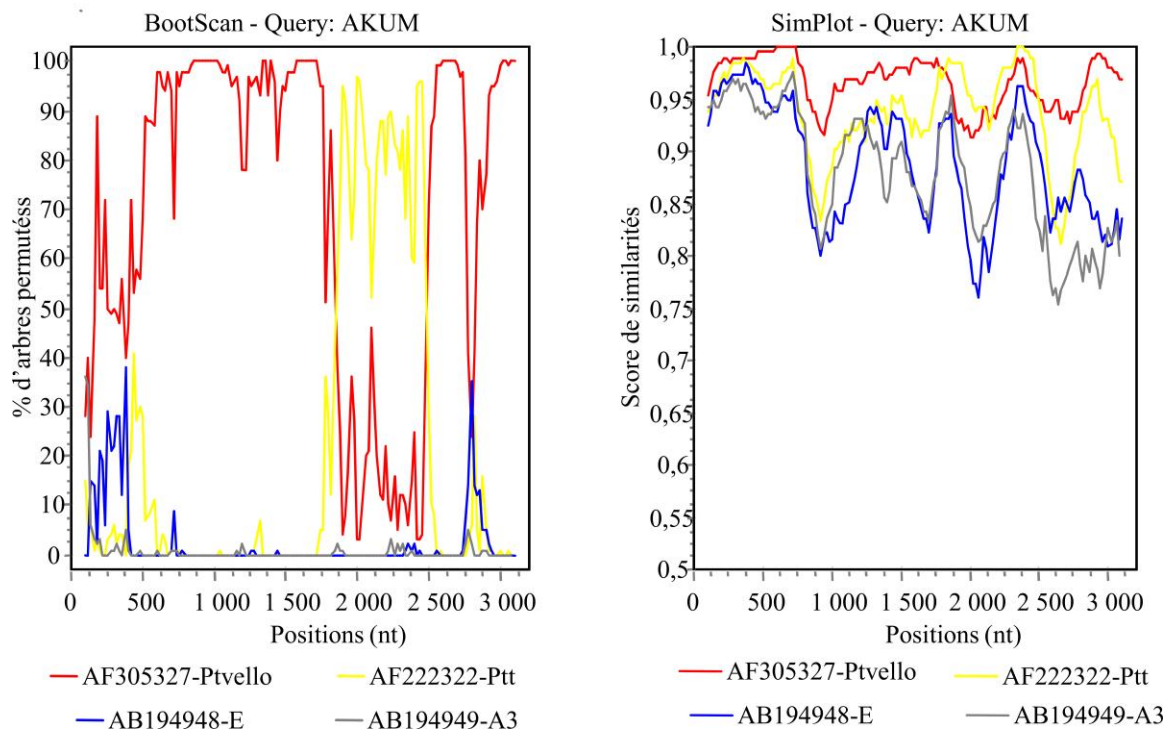


Figure 51 : Pourcentage d'arbres permutés et score de similarité des souches présentant la recombinaison chez le petit singe AKUM.

Les pourcentages d'arbres permutés (BOTSCAN) et les courbes de similarité (SIMPLOT) ont été générés en utilisant des fenêtres de 200 nucléotides (nt), des incréments de 20 nt, le modèle « Kimura 2- parameter », et un ratio de transition-transversion (Ts/Tv) de 10.

III.1.3.11. Recherche des recombinaisons génétiques du VHD chez les populations les porteurs chroniques VHB et les pygmées

La recherche des recombinaisons génétiques entre les différents génotypes de VHD a été effectuée sur 35 génomes complets de VHD obtenus chez 17 porteurs chroniques VHB et 18 pygmées. Les arbres phylogénétiques ont été construits au niveau de trois fragments subgénomiques du VHD. Le premier couvrant les positions 1-900 (désigné fragment A), le deuxième couvrant les positions 901-1300 (désigné fragment B) et le troisième couvrant les positions 1301-1680 (désigné fragment C).

L'analyse de trois arbres phylogénétiques obtenus n'a montré aucune recombinaison pour les souches de VHD obtenues chez les porteurs chroniques VHB. Par contre, 4/18 (22,2%) souches de VHD obtenues chez les pygmées ont présentées des recombinaisons génétiques de type 1/7. Deux profils de recombinaisons génétiques 1/7 ont été notés (**Figure 51**).

- Recombinant 1/7/1 (génotype 1 dans le fragment A, génotype 7 dans le fragment B et génotype 1 dans le fragment C) pour les souches Mebak 25 et Mebak 58.

- Recombinant 7/1/7 (génotype 7 dans le fragment A, génotype 1 dans le fragment B et génotype 7 dans le fragment C) pour les souches Mebak 57 et Bobak 95.

Dans le but de confirmer les recombinaisons génétiques obtenues ci-dessus, chacune des 4 souches de VHD de Pygmées ayant donné des génotypes différents après analyse phylogénétique de chacun des 3 fragments subgénomiques a été analysée avec le logiciel SIMPLOT/BOTSCAN. De façon globale les deux profils de recombinaison ont été confirmés comme le montre les différentes figures présentant les pourcentages d'arbres permutés (**Figure 52**).

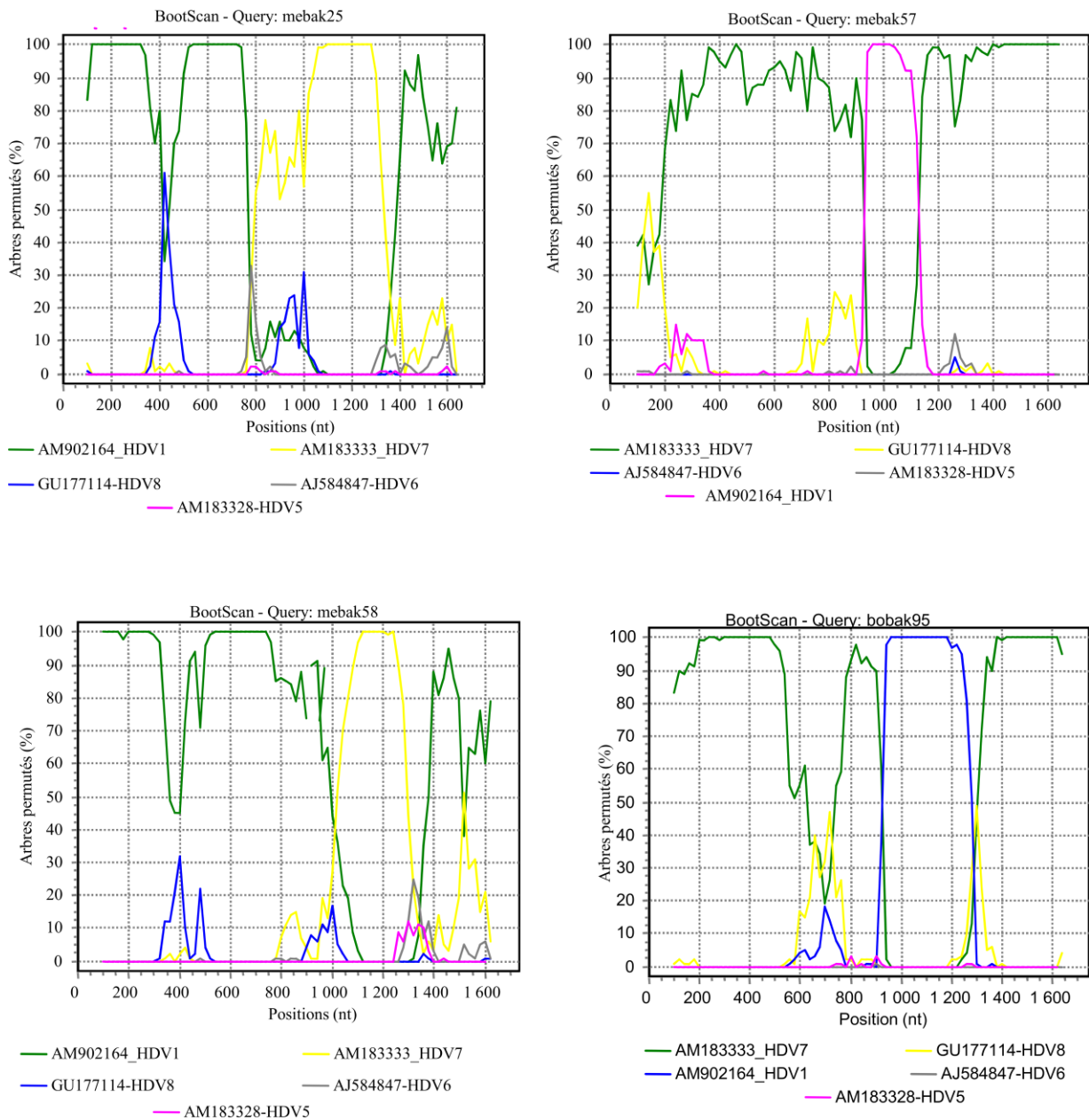


Figure 53 : Pourcentage d’arbres permutés des souches présentant la recombinaison du VHD chez les Pygmées du Cameroun.

Les pourcentages d’arbres permutés (BOTSCAN) et les courbes de similarité (SIMPLLOT) ont été générés en utilisant des fenêtres de 200 nucléotides (nt), des incréments de 20 nt, le modèle « Kimura 2- parameter », et un ratio de transition-transversion (Ts/Tv) de 10.

III.1.3.12. Evaluation de la transmission inter-espece du VHB

L'un des objectifs spécifiques de notre étude était d'évaluer les possibilités de transmission entre les souches de VHB obtenues chez les populations humaines et les PNH. Pour cela, nous avons comparé sur un même arbre phylogénétique toutes les séquences du VHB obtenues dans cette étude et celles des séquences de références obtenues dans GenBank.

Les souches identifiées chez les petits singes de la famille de *Cercopithecidae* se sont regroupées avec les VHB humains de génotype E (**Figure 25**). Ces résultats suggèrent le passage du VHB de l'homme au petit singe et vice versa.

La séquence du VHB obtenu chez le petit singe AKUM s'est aussi regroupée avec les séquences VHB des Chimpanzés (**Figure 26**) suggérant aussi une transmission inter-espèce entre ces deux espèces de PNH.

Enfin, nous avons constaté des possibilités de transmission inter-espèce des souches de VHB entre les chimpanzés de la sous-espèce *Pan troglodytes troglodytes* et et la sous-espèce *Pan troglodytes vellerosus* identifiées dans cette étude. (**Figure 47 et 48**).

III.2 DISCUSSION

L'objectif général de notre travail visait à : i) déterminer la prévalence des infections par les VHB et VHD au sein des populations humaines et les PNH du Cameroun, ii) déterminer la distribution des génotypes/sous-types des VHB et VHD au sein de ces trois populations et en étudier la diversité génétique, et enfin iii) évaluer les possibilités de transmissions inter-espèces du VHB entre ces populations.

Dans notre étude, la prévalence de l'AgHBs globale de 11,8% retrouvée au sein des trois grands groupes ethniques pygmées de notre étude est comparable à celles rapportées par les études antérieures au sein des populations Pygmées Baka et les populations bantou (Chiaramonte *et al.*, 1991; Kurbanov *et al.*, 2005; Ndumbe *et al.*, 1993) indiquant que le Cameroun appartient bel et bien à la zone de haute prévalence (>8%) selon la classification de l'OMS (WHO, 2004). Les résultats présentés dans cette étude, contrairement aux études précédentes sur le même sujet, a inclus tous les 3 grands groupes Pygmées du Cameroun et a été effectuée sur un grand nombre d'échantillons. Les études antérieures chez les pygmées du Cameroun n'ont été effectuées qu'au sein de l'ethnie Baka de l'Est et du Sud (Kowo *et al.*, 1995; Kurbanov *et al.*, 2005; Ndumbe *et al.*, 1993; Ndumbe *et al.*, 1994). Ces études ont été réalisées avec des échantillonnages de faible taille (environ 150 individus). Il était donc nécessaire et important d'avoir des données sur les deux autres grands groupes ethniques à savoir les Bakola et les Bedzam.

Les enfants âgés de moins de 10 ans était la tranche d'âge la plus touchée par le VHB dans notre étude, ceci suggère que la transmission dans la petite enfance serait la principale voie de transmission du VHB dans cette population. Ce résultat confirme les résultats des études antérieures réalisées en Afrique (Kew, 1992; Kramvis & Kew, 2007).

Au Cameroun, l'effectif de la population des PNH est estimé à environ 20000 individus réparti entre 30 et 31 espèces (Caldecott, 2005; Gautier-Hion A., 1999). Aucune donnée de la circulation des VHB et VHD n'était disponible dans cette population, nous avons donc réalisé cette étude dans le but de générer ces informations. Dans notre étude, nous avons trouvé une prévalence moyenne de l'AgHBs de 5,2% variant selon les espèces de PNH. Ce résultat se

rapproche de ceux rapportés dans des études similaires en Afrique Centrale (Grethe *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 2000; Makuwa *et al.*, 2006; Starkman *et al.*, 2003). Notre étude a confirmé la présence du VHB chez les grands singes d'Afrique (Chimpanzé et Gorille).

Un résultat intéressant de ce travail est la détection de l'AgHBs chez les petits singes appartenant à 4 espèces de la famille des Cercopithecidae. La présence de l'AgHBs n'avait jamais été mise en évidence dans cette famille (Deinhardt, 1976; Eichberg & Kalter, 1980; Makuwa *et al.*, 2006; Makuwa *et al.*, 2003; Michaels *et al.*, 1996; Starkman *et al.*, 2003). Une des hypothèses émises pour expliquer cette absence de détection de l'AgHBs chez les petits singes était que les souches des grands primates (chimpanzés, gorilles, orangs-outans et gibbons) étant proches de celles des VHB humaines, ceci favoriserait les réactions sérologiques croisées avec les anticorps monoclonaux des sérotypes humains. Les PNH de la famille des cercopithecidae quant à eux seraient infectés par des souches plus divergentes que celles décrites précédemment, ce qui rendrait leur AgHBs incapable de réagir avec les anticorps spécifiques des sérotypes humains. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la détection de l'AgHBs chez les petits singes inclus dans notre étude. Premièrement, il pourrait s'agir des faux positifs (réactivité non spécifique) au vu de la faible densité optique obtenue en ELISA, ce qui pourrait être confirmé par l'absence de détection de l'ADN du VHB dans tous les échantillons. Deuxièmement, il pourrait s'agir des vrais positifs en ELISA mais possédant des séquences nucléotidiques très divergentes non amplifiables par les amorces et les protocoles utilisés au cours de la première partie de l'étude (MacDonald *et al.*, 2000; Starkman *et al.*, 2003). Dans notre étude, l'ADN du VHB a été détecté chez les 5 petits singes par amplification de la région S du VHB en utilisant les amorces développées par Olinger et collaborateurs (Olinger *et al.*, 2006). Cette détection du génome est d'autant plus intéressante qu'elle a été trouvée chez plusieurs espèces de la famille de Cercopithecidae (un *Cercopithecus cephus*, un *Cercopithecus torquatus*, *Mandrillus sphinx*, *Cercopithecus erythrotis*, *Papio anubis*). Ce fort taux de détection du génome du VHB chez les petits singes ayant des densités optiques faibles pour la détection de l'AgHBs milite en faveur d'une sous-estimation de la prévalence de l'AgHBs chez les petits singes. Il est donc important de développer des tests sérologiques (plus sensibles) capables de détecter un

grand panel de VHB potentiellement divergents chez les PNH requis pour la recherche du VHB chez ces Cercopithecidae. Ces résultats viennent conforter ceux de l'étude Sud Africain publiée en 2013 montrant la circulation de l'ADN du VHB chez les babouins (15/69) tous négatifs pour la recherche d'antigène et d'anticorps HBs (Caroline Dickens, 2013). Dickens et collaborateurs ont amplifié huit fragments subgénomiques et chevauchants du VHB. Ils ont pour cela utilisé les amorces de l'étude de Hu et collaborateurs (Hu et al) et des amorces internes au laboratoire

Dans notre étude, nous avons trouvé des taux de prévalence de l'anticorps delta de 17,6% et 60% chez les porteurs chroniques VHB et les pygmées, respectivement. Ces pourcentages sont en rapports avec les personnes porteuses de l'AgHBs. Ces résultats se rapprochent de ceux rapportés dans les études antérieures réalisées au Cameroun par d'autres auteurs (Ndumbe, 1991; Ndumbe *et al.*, 1993; Poveda *et al.*, 1986) et confirment l'endémicité de ce virus au Cameroun.

Dans ce travail, nous avons aussi trouvé des taux de détection élevés de l'ARN VHD chez les patients positifs en anticorps delta. Les taux de détection de l'ARN de 61% et 50% respectivement chez les porteurs chroniques VHB et les pygmées. Ces résultats indiquent un faible taux de clairance du VHD dans ces populations. Le VHD s'associe au VHB soit en co-infection soit en sur-infection. Au cours de l'histoire naturelle de l'infection par le VHD, la co-infection VHB/VHD conduit à la chronicité chez une faible proportion de personne alors qu'en cas de sur-infection une forte proportion évolue vers la chronicité (Govindarajan, 1986; Govindarajan *et al.*, 1986a; Govindarajan *et al.*, 1986b; Heidrich *et al.*, 2009). Nos résultats suggèrent donc que la majorité des sujets inclus dans notre étude ont contacté le VHD en sur-infection du VHB au vue du fort taux de détection de l'ARN dans les deux populations humaines de notre étude.

Une co-circulation à niveau égale des génotypes A et E du VHB avec une forte hétérogénéité au sein des souches de génotype A chez les porteurs chroniques VHB et une homogénéité au sein des souches de génotype E. circulation du sous génotype VHB-A3 et une introduction récente du VHB-E dans les trois groupes pygmées du Cameroun

Nos résultats confirment la co-circulation et à répartition égale des génotypes A et E chez les pygmées vivant au Cameroun tel que rapporté par d'autres études similaires (Hubschen *et al.*, 2011; Kouanfack *et al.*, 2012; Kurbanov *et al.*, 2005; Mulders *et al.*, 2004; Olinger *et al.*, 2006). Par contre, la récente étude de Ducannelle et collaborateurs (Alexandra Ducannelle, 2013) a rapporté une forte prévalence du génotype E par rapport au génotype A dans la ville de Tokombéré de la région de l'Extrême Nord du Cameroun. Cette prédominance des génotypes E au niveau de cette région pourrait s'expliquer par la proximité de la région d'étude au Nigeria, région d'Afrique de l'Ouest où prédomine le génotype E du VHB.

La grande hétérogénéité des souches de génotype A avec circulation de plus de 3 sous-génotypes du VHB A3, A5 et A7 est en faveur de l'ancienneté de ce génotype au Cameroun. Par contre l'homogénéité des souches de génotype E suggère une introduction plus récente de ce génotype au Cameroun.

Notre travail nous a permis d'ajouter dans la banque des séquences trois nouvelles séquences de génomes complets de gorilles et deux nouvelles de chimpanzés. L'analyse phylogénétique des séquences du VHB obtenues dans notre étude a montré un regroupement des séquences VHB des PNH d'Afrique dans un cluster différent de celui des séquences des VHB des PNH d'Asie. Ceci indique une spécificité géographique du VHB chez les PNH. On note une diversité génétique du VHB plus importante chez les grands singes d'Asie (deux génotypes) que chez ceux d'Afrique (un seul génotype). Dans le cluster des séquences VHB des PNH d'Afrique d'une part et d'Asie d'autre part, il ya un regroupement des séquences de VHB par espèce hôte. Ce regroupement des séquences VHB par espèce est en faveur d'une spécificité VHB par espèce. L'analyse des séquences VHB des chimpanzés montre que la séquence du VHB du chimpanzé CPZCAM06, qui appartient à la sous-espèce de *pan troglodytes troglodytes*, se trouve dans un même cluster que les séquences précédemment décrites chez les chimpanzés de la même sous-espèce. Ce groupe est distinct de celui de la séquence VHB du chimpanzé CPZCAM 17, appartenant à la sous-espèce *pan troglodytes velloresus* qui s'est groupé avec les séquences VHB de la sous-espèce *pan troglodytes velloresus*. Les groupes des séquences du VHB des chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* et *pan troglodytes velloresus* sont bien différents malgré

que les deux espèces partagent le même environnement. Ceci est en faveur d'une spécificité de sous espèce du VHB chez les chimpanzés. Ces observations corroborent les résultats rapportés dans l'étude de Starkman et collaborateurs (Starkman *et al.*, 2003).

Les trois nouvelles séquences VHB des gorilles caractérisées dans ce travail apportent des arguments permettant de confirmer l'existence d'un groupe de VHB spécifique des gorilles. En effet, la présence d'une unique séquence du VHB de gorille dans le cluster des VHB des chimpanzés (Grethe *et al.*, 2000) pouvait faire penser à une contamination de laboratoire ou une transmission inter-espèce du VHB du chimpanzé au gorille durant la captivité (MacDonald *et al.*, 2000; Starkman *et al.*, 2003) Nos résultats permettent donc de confirmer l'existence d'un génotype VHB « gorille ».

Nos résultats ont montré la co-circulation des génotypes 1, 5, 6 et 7 du VHD. Les trois génotypes VHD-5, VHD-6 et VHD-7 ont formé des clusters avec les souches identifiées en Afrique témoignant de la circulation de ces génotypes dans le continent. Par contre le génotype VHD-8 récemment identifié au Gabon comme étant endémique en Afrique Centrale n'a pas été identifié parmi les souches de notre étude (Maria Makuwa, 2009; Maria Makuwa, 2008) La distance génétique moyenne entre les souches de VHD-1 a été de 16,7%. Cette distance moyenne est élevée que celle observée en comparant toutes les séquences du génotype 1 identifiées à travers le monde et disponibles dans les banques génomiques publiques. Cette forte diversité génétique observée au sein du génotype 1 du VHD au Cameroun associée à sa prédominance est en faveur de l'ancienneté de ce virus au Cameroun. Un autre résultat non négligeable est la description des formes recombinantes au sein des VHD des populations Pygmées. La nécessité d'entreprendre des nouvelles recherches au sein de cette population s'impose pour avoir une cartographie génotypique du VHD chez les pygmées du Cameroun.

Nos résultats sur la recherche des phénomènes de recombinaison entre les souches de VHB identifiées dans ce travail ont montré des observations très intéressantes. Des recombinaisons génétiques ont été observées entre les souches de génotype A et celles de génotype E au sein de la population des porteurs chroniques VHB, suggérant la co-circulation de

ces deux génotypes dans la dite population depuis longtemps. Ces observations viennent conforter celles des études antérieures sur la description des recombinants A/E dans la population des porteurs chroniques VHB du Cameroun (Kurbanov *et al.*, 2005). Par contre, ces phénomènes de recombinaison n'ont pas été observés sur les souches de génotypes A et E identifiées chez les Pygmées ; cela suggérerait une introduction très récente du génotype E d'origine Ouestr Africaine au sein de cette population Pygmée.

Un autre résultat tout aussi intéressant est la description de recombinaison génétique entre les souches VHB des sous espèces *Pan troglodytes troglodytes* et *Pan troglodytes veloresus* des chimpanzées. Ces observations viennent renforcer les récentes données publiées sur les échanges génétiques entre les souches de VHB des chimpanzées et de gorilles (Lyons *et al.*, 2012). En plus la séquence complète de VHB identifiée chez le petit de notre étude est une souche recombinante des virus des sous espèces de chimpanzées dont *Pan troglodytes troglodytes* et *Pan troglodytes veloresus*. L'hypothèse la plus plausible est que cette souche retrouvée chez ce petit singe se serait recombinée avant son passage à ce dernier. La transmission inter-espèce et inter-sous espèce est dorénavant possible entre les PNH vivant dans le même environnement géographique. La majorité de sites de recombinaison se situe dans la région couvrant 1640-1900 (Yang *et al.*, 2006). Les recombinaisons surviennent souvent au niveau des gènes voisins (Simmonds & Midgley, 2005; Yang *et al.*, 2006)

L'une de nos hypothèses de départ en croisant les souches VHB des Pygmées et celles des PNH était de voir des possibilités de regroupement entre les souches identifiées dans ces deux groupes de population car partageant la même sphère géographique et environnementale. Mais, de façon surprenante aucune relation de parenté génétique n'a été observée entre les souches virales identifiées au sein des deux groupes de populations.

Un résultat aussi intéressant a été le regroupement phylogénétique des quatre souches de VHB identifiées chez les petits singes de la famille de Cercopithecidae avec le génotype E humain, montrant ainsi une relation de parenté entre la souche humaine et la souche de PNH. Les petits singes sont souvent pris comme animal de compagnie par les hommes, il est possible que

ces échanges du VHB se soient effectués à travers la domestication des petits singes. A ce stade, nous ne pouvons pas déjà tirer des conclusions sur l'origine de l'expansion du génotype E au sein de la population humaine. Des études ultérieures sont nécessaires en essayant d'amplifier des souches VHB de petits singes en liberté dans leur milieu naturel.

La reconstruction de l'histoire évolutive du VHB en utilisant les séquences des variants VHB infectant les PNH et les humains s'est avérée complexe et difficile. En ce qui concerne le VHB, environ trois hypothèses, actuellement non prouvées, ont été émises à propos de son origine et de son évolution du VHB chez les primates.

Les études les plus anciennes proposent que le VHB a co-évolué avec « l'homme moderne » durant sa migration à partir de l'Afrique il y a 10000 ans (Magnius & Norder, 1995; Norder *et al.*, 1994). Les différents génotypes humains du VHB ont évolué et se sont différenciés durant la dispersion de l'espèce humaine dans tous les continents. La principale limite de cette hypothèse est qu'elle n'explique pas la position des variants du VHB des PNH qui, à l'exception du variant isolé chez le singe laineux, sont intercalés entre les génotypes humains dans l'arbre phylogénétique

L'une des hypothèses alternatives à la précédente suggère une origine relativement récente du VHB chez l'homme. Le VHB s'est propagé en Europe et dans tous les continents à partir des Amériques après le contact entre les Européens et les peuples indigènes il ya environ 400 ans (Bollyky & Holmes, 1999). Cette hypothèse est basée uniquement sur les données phylogénétiques : l'isolation du VHB le plus divergent chez le singe laineux du Nouveau Monde *Lagothrix lagotrica* ; caractérisation des génotypes F et H (les plus divergents parmi les génotypes humains) en Amérique du Sud et en Amérique Centrale. Cette hypothèse devient improbable lorsqu'on considère les données virologiques et épidémiologiques. Parmi ces données discordantes, on a : i) la diversification du VHB en plusieurs génotypes distincts dans l'Ancien Monde (A,B, C, D et E) différents de ceux trouvés spécifiquement dans les Amériques (F et H) ; ii) les populations des porteurs chroniques se trouvent majoritairement en Afrique Subsaharienne et en Asie du Sud-Est ; iii) la mise en évidence de l'endémicité du VHB chez les

PNH sauvages de l'Ancien Monde dans cette étude ainsi que dans les études antérieures (MacDonald *et al.*, 2000; Vaudin *et al.*, 1988).

La troisième hypothèse stipule que : les variants du VHB trouvés chez les chimpanzés, les gibbons, les ourangs-outangs et les singes laineux ont co-évolué avec leurs hôtes spécifiques pendant 10 à 30 millions d'années (MacDonald *et al.*, 2000). Les différents génotypes trouvés chez l'homme sont venus de multiples épisodes de transmission inter-espèces à partir de plusieurs espèces de PNH infectés par des génotypes spécifiques. Cette hypothèse est supportée par le fait que les zones de forte prévalence sont celles où on trouve des populations de PNH : l'Afrique Subsaharienne, l'Amérique du Sud et l'Asie du Sud-Est. Le problème majeur de l'hypothèse de la transmission inter-espèce du VHB des PNH à l'homme est que des variants de VHB communs aux primates humains et non humains n'ont pas été identifiés. Les données phylogénétiques antérieures sont incompatibles avec une transmission inter-espèce récente du VHB entre les primates humains et non humains qui co-existent dans la même région (Simmonds & Midgley, 2005; Starkman *et al.*, 2003). De même, dans la présente étude, le regroupement phylogénétique des variants du VHB des grands singes du Cameroun de façon distincte des génotypes humains n'indique pas une transmission inter-espèce récente. La seule exception à la spécificité d'hôte a été rapportée par la mise en évidence d'un VHB de génotype E (un variant humain) chez un chimpanzé en captivité (Takahashi *et al.*, 2000). A l'état actuel aucune donnée n'indique qu'il existe des cas de génotypes communs entre les primates humains et les PNH dans les conditions naturelles. Cette exception à la spécificité d'espèce du VHB indique cependant que les données supplémentaires sont requises avant toute conclusion définitive.

CHAPITRE IV

CONCLUSION, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

IV.1. CONCLUSION

Ce travail a permis d'obtenir une bonne connaissance sur la circulation des virus des hépatites B et D chez les porteurs chroniques VHB et les pygmées d'une part et les PNH d'autre part du Cameroun.

Le VHB circule de façon endémique au sein des populations pygmées ainsi que chez les PNH du Cameroun avec des taux de prévalence de l'AgHBs variable selon les populations étudiées. Le VHD circule aussi de façon endémique au Cameroun avec des prévalences plus élevées dans les populations pygmées.

Pour le VHB, les génotypes E et A co-circulent aussi bien chez les pygmées que chez les porteurs chroniques VHB. On note une importante variabilité à l'intérieur du génotype A et notamment au sein de la population des porteurs chroniques VHB et une circulation du sous génotype A3 au sein de la population pygmée. Des formes recombinantes A/E circulent au sein de la population des porteurs chroniques VHB. Les génotypes du VHB sont spécifiques d'espèces et de sous-espèces chez les PNH. Pour le VHD, plusieurs génotypes circulent au sein de la population humaine avec une forte variabilité intra génotype 1. Des formes recombinantes du génotype 1 et 7 ont été rapportées au sein de la population Pygmée du Cameroun.

Les VHB recombinent entre les PNH et les possibilités de transmissions inter-espèces et inter sous-espèces des PNH ont été observées. La circulation du VHB au sein de la population des petits singes a été démontrée dans ce travail avec une possibilité de passage du VHB de l'homme au petit singe, mais ces résultats restent à confirmer par des études futures.

L'ensemble de ces résultats objective la complexité épidémiologique de l'infection par le VHB et le VHD au Cameroun liée à la probable endémicité de ces infections, à la grande variabilité génétique de ces virus et à la diversité des modes de transmission et d'évolution de ces virus au sein des populations humaines et simiennes.

IV.2. PERSPECTIVES

Des travaux supplémentaires permettant de comprendre le mécanisme de transmission du VHB entre les humains et les petits singes sont indispensables.

Des travaux supplémentaires permettant de mieux caractériser la variabilité génétique du VHD au sein de la population pygmée sont indispensables

Des travaux permettant de déterminer les séroprévalences des infections par le VHB et VHD sur le plan national sont indispensables en vue de déterminer leur impact sur la santé publique nationale.

IV.3. RECOMMANDATIONS

Afin de limiter la propagation de cette infection, nous recommandons une vaccination à large échelle de la population. La vaccination contre le VHB a été introduite dans le programme élargi de vaccination du Cameroun en 2005 et elle se limite encore aux zones urbaines. Ce programme devrait s'étendre aussi aux zones rurales, ainsi que chez les pygmées afin de prévenir l'expansion de cette maladie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahn, S., Kramvis, A., Kawai, S., Spangenberg, H., Li, J., Kimbi, G., Kew, M., Wands, J. & Tong, S. (2003).** Sequence variation upstream of precore translation initiation codon reduces hepatitis B virus e antigen production. *Gastroenterology* **125**, 1370-1378.
- Alter, H. J. & Blumberg, B. S. (1966).** Further Studies on a "New" Human Isoprecipitin System (Australia Antigen). *Blood* **27**, 297-309.
- Andrade, Z., Lesbordes, J., Ravisse, P., Parana, R., Prata, A., Barberino, J. & Trepo, C. (1992).** Fulminant hepatitis with microvesicular steatosis (a histologic comparison of cases occurring in Brazil--Labrea hepatitis--and in central Africa--Bangui hepatitis). *Review of Tropical Medicine*: **25**, 155-160.
- Angus, P., Vaughan, R., Xiong, S., Yang, H., Delaney, W., Gibbs, C., Brosgart, C., Colledge, D., Edwards, R., Ayres, A., Bartholomeusz, A. & Locarnini, S. (2003).** Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* **125**, 292-297.
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H. & Magnus, L. O. (2002).** Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *Journal of General Virology* **83**, 2059-2073.
- Asselah, T., Ripault, M. P., Castelnaud, C., Giuily, N., Boyer, N. & Marcellin, P. (2005).** The current status of antiviral therapy of chronic hepatitis B. *Journal of clinical virology* : **34 Suppl 1**, S115-124.
- Baptista, M., Kramvis, A. & Kew, M. (1999).** High prevalence of 1762(T) 1764(A) mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers. *Hepatology*: **29**, 946-953.
- Barrera, A., Guerra, B., Notvall, L. & Lanford, R. E. (2005).** Mapping of the Hepatitis B Virus Pre-S1 Domain Involved in Receptor Recognition. *Journal of Virology* **79**, 9786-9798.
- Beasley, R. P. (1988).** Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* **61**, 1942-1956.
- Beath, S. V., Boxall, E. H., Watson, R. M., Tarlow, M. J. & Kelly, D. A. (1992).** Fulminant hepatitis B in infants born to anti-HBe hepatitis B carrier mothers. *Biology and Microbiology* **304**, 1169-1170.

- Benvegna, L., Fattovich, G., Noventa, F., Tremolada, F., Chemello, L., Cecchetto, A. & Alberti, A. (1994).** Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study. *Cancer* **74**, 2442-2448.
- Bernuau, J., Rueff, B. & Benhamou, J. (1986).** Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Seminars in liver disease* **6**, 97-106.
- Bertoletti, A., Costanzo, A., Chisari, F. V., Levrero, M., Artini, M., Sette, A., Penna, A., Giuberti, T., Fiaccadori, F. & Ferrari, C. (1994).** Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *The Journal of experimental medicine* **180**, 933-943.
- Bertoni, R., Sidney, J., Fowler, P., Chesnut, R., Chisari, F. & Sette, A. (1997a).** Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis. *The Journal of clinical investigation* **100**, 503-513.
- Bertoni, R., Sidney, J., Fowler, P., Chesnut, R. W., Chisari, F. V. & Sette, A. (1997b).** Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis. *The Journal of clinical investigation* **100**, 503-513.
- Block, T. M., Mehta, A. S., Fimmel, C. J. & Jordan, R. (2003).** Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **22**, 5093-5107.
- Blumberg, B., Sutnick, A. & London, W. (1968).** Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. *Journal of Virology* **44**, 1566-1586.
- Bock, C., Tillmann, H., Maschek, H., Manns, M. & Trautwein, C. (1997).** A preS mutation isolated from a patient with chronic hepatitis B infection leads to virus retention and misassembly. *Gastroenterology* **113**, 1976-1982.
- Bollyky, P. & Holmes, E. (1999).** Reconstructing the complex evolutionary history of hepatitis B virus. *Journal of Molecular and Evolution* **49**, 130-141.
- Bottcher, B., Kiselev, N., Stel'Mashchuk, V., Perevozchikova, N., Borisov, A. & Crowther, R. (1997a).** Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *Journal of Virology* **71**, 325-330.
- Bottcher, B., Wynne, S. & Crowther, R. (1997b).** Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* **386**, 88-91.

- Bouvier, G. & Williams, A. (1975).** Serotypes of hepatitis B antigen (HBs Ag): the problem of "new" determinants, as exemplified by "t". *Journal of Virology* :**270**, 165-171.
- Brunetto, M., Giarin, M., Saracco, G., Oliveri, F., Calvo, P., Capra, G., Randone, A., Abate, M., Manzini, P. & Capalbo, M. (1993).** Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **105**, 845-850.
- Bueno, H., Indacochea, S., Oberst, R. & Chauca, G. (1994).** [Role of hepatitis B and delta viruses in the etiology of hepatocarcinoma and other chronic liver diseases]. *Review Gastroenterology Peru* **14**, 135-139.
- Calattini, S., Betsem, E., Bassot, S., Chevalier, S., Tortevoeye, P., Njouom, R., Mahieux, R., Froment, A. & Gessain, A. (2011).** Multiple retroviral infection by HTLV type 1, 2, 3 and simian foamy virus in a family of Pygmies from Cameroon. *Journal of Virology* **410**, 48-55.
- Caldecott, J., & Miles, L (2005).** World atlas of Great Apes and their conservation In *prepared at UNEP World conservation Monitoring Centre*. University of California Press, Berkeley, USA.
- Calio, R., Villani, N., Balestra, E., Sesa, F., Holy, A., Balzarini, J., De Clercq, E., Perno, C. F. & Del Gobbo, V. (1994).** Enhancement of natural killer activity and interferon induction by different acyclic nucleoside phosphonates. *Antiviral research* **23**, 77-89.
- Carman, W., Korula, J., Wallace, L., MacPhee, R., Mimms, L. & Decker, R. (1995).** Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet* **345**, 1406-1407.
- Caroline Dickens, M. C. K., Robert H. Purcell, and Anna Kramvis (2013).** Occult hepatitis B virus infection in chacma Baboons, South Africa. *Emerging infectious diseases* **19**.
- Chang, C., Zhou, S., Ganem, D. & Strandring, D. N. (1994).** Phenotypic mixing between different hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cis preferential. *Journal of Virology* **68**, 5225-5231.
- Chang, F. L., Chen, P. J., Tu, S. J., Wang, C. J. & Chen, D. S. (1991).** The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. *Journal of Virology* :**88**, 8490-8494.
- Chang, M. H. (2000).** Natural history of hepatitis B virus infection in children. *Journal of gastroenterology and hepatology* **15 Suppl**, E16-19.

- Chemin, I., Zoulim, F., Merle, P., Arkhis, A., Chevallier, M., Kay, A., Cova, L., Chevallier, P., Mandrand, B. & Trepo, C. (2001).** High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *Journal of hepatology* **34**, 447-454.
- Chen, Y.S., Huang, W.H., Hong, S.Y., Tsay, Y.G. & Chen, P.J. (2008).** ERK1/2-Mediated Phosphorylation of Small Hepatitis Delta Antigen at Serine 177 Enhances Hepatitis Delta Virus Antigenomic RNA Replication. *Journal of Virology* **82**, 9345-9358.
- Chiaramonte, M., Stroffolini, T., Ngatchu, T., Rapicetta, M., Lantum, D., Kaptue, L., Chionne, P., Conti, S., Sarrecchia, B. & Naccarato, R. (1991).** Hepatitis B virus infection in Cameroon: a seroepidemiological survey in city school children. *Journal of medical virology* **33**, 95-99.
- Chisari, F. V. & Ferrari, C. (1995).** Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annual review of immunology* **13**, 29-60.
- Coleman, P. F. (2006).** Detecting hepatitis B surface antigen mutants. *Emerging infectious diseases* **12**, 198-203.
- Conway, J., Cheng, N., Zlotnick, A., Stahl, S., Wingfield, P., Belnap, D., Kanngiesser, U., Noah, M. & Steven, A. (1998).** Hepatitis B virus capsid: localization of the putative immunodominant loop (residues 78 to 83) on the capsid surface, and implications for the distinction between c and e-antigens. *Journal Molecular Biology* **279**, 1111-1121.
- Cooreman, M., Leroux-Roels, G. & Paulij, W. (2001).** Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Biomedical Society* **8**, 237-247.
- Cooreman, M., van Roosmalen, M., te Morsche, R., Sunnen, C., de Ven, E., Jansen, J., Tytgat, G., de Wit, P. & Paulij, W. (1999).** Characterization of the reactivity pattern of murine monoclonal antibodies against wild-type hepatitis B surface antigen to G145R and other naturally occurring "a" loop escape mutations. *Hepatology*: **30**, 1287-1292.
- Courouce, A., Bouchardeau, F., Le Marrec, N., Boulard, G. & Soulier, J. (1983).** The use of hepatitis B vaccine as booster for donors immune to HBV for the production of hepatitis B immunoglobulin (HBIG). *Journal of Virology*:**54**, 333-340.
- Courouce, A. & Pillonel, J. (1996).** [Estimation of risk of virus transmission in hepatitis B and C and human retrovirus via transfusion of labile blood derivatives]. *Transfusion Clinical Biology* **3**, 13-18.

- Crowther, R., Kiselev, N., Bottcher, B., Berriman, J., Borisova, G., Ose, V. & Pumpens, P. (1994).** Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**, 943-950.
- Dane, D. S., Cameron, C. H. & Briggs, M. (1970).** Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**, 695-698.
- Davis, G. L., Hoofnagle, J. H. & Waggoner, J. G. (1984).** Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **86**, 230-235.
- Deinhardt, F. (1976).** Hepatitis in primates. *Adv Virus Res* **20**, 113-157.
- Delaney, W. E., IV, Ray, A. S., Yang, H., Qi, X., Xiong, S., Zhu, Y. & Miller, M. D. (2006).** Intracellular Metabolism and In Vitro Activity of Tenofovir against Hepatitis B Virus. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2471-2477.
- Delaney, W. E., IV, Yang, H., Westland, C. E., Das, K., Arnold, E., Gibbs, C. S., Miller, M. D. & Xiong, S. (2003).** The Hepatitis B Virus Polymerase Mutation rtV173L Is Selected during Lamivudine Therapy and Enhances Viral Replication In Vitro. *Journal of Virology* **77**, 11833-11841.
- Dienes, H. P., Hutteroth, T., Hess, G. & Meuer, S. C. (1987).** Immunoelectron microscopic observations on the inflammatory infiltrates and HLA antigens in hepatitis B and non-A, non-B. *Hepatology*: **7**, 1317-1325.
- Ducancelle A., P. A., Birguel J., Mansour W., Pivert A, Le Guillou-Guillemette H, Sobnangou J.J., Rameau A., Huraux J.M., Lunel-Fabiani F. (2013).** High Endemicity and Low Molecular Diversity of Hepatitis B Infections in Pregnant Women in Rural District of North Cameroon. *PloS one* **8**, 11-18.
- Edmunds, W., Medley, G., Nokes, D., O'Callaghan, C., Whittle, H. & Hall, A. (1996).** Epidemiological patterns of hepatitis B virus (HBV) in highly endemic areas. *Epidemiology Infectious* **117**, 313-325.
- Eichberg, J. & Kalter, S. (1980).** Hepatitis A and B: serologic survey of human and nonhuman primate sera. *Journal of Virology*: **30**, 541-543.
- Farci, P., Mandas, A., Coiana, A., Lai, M., Desmet, V., Van Eyken, P., Gibo, Y., Caruso, L., Scaccabarozzi, S. & Criscuolo, D. (1994).** Treatment of chronic hepatitis D with interferon alfa-2a. *The New England journal of medicine* **330**, 88-94.

- Fattovich, G., Bortolotti, F. & Donato, F. (2008).** Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *Journal of hepatology* **48**, 335-352.
- Fattovich, G., Brollo, L., Alberti, A., Realdi, G., Pontisso, P., Giustina, G. & Ruol, A. (1990).** Spontaneous reactivation of hepatitis B virus infection in patients with chronic type B hepatitis. *Liver* **10**, 141-146.
- Fattovich, G., Brollo, L., Giustina, G., Noventa, F., Pontisso, P., Alberti, A., Realdi, G. & Ruol, A. (1991).** Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B. *Gut* **32**, 294-298.
- Fattovich, G., Giustina, G., Christensen, E., Pantalena, M., Zagni, I., Realdi, G. & Schalm, S. W. (2000).** Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut* **46**, 420-426.
- Fattovich, G., Rugge, M., Brollo, L., Pontisso, P., Noventa, F., Guido, M., Alberti, A. & Realdi, G. (1986).** Clinical, virologic and histologic outcome following seroconversion from HBeAg to anti-HBe in chronic hepatitis type B. *Hepatology*: **6**, 167-172.
- Feitelson, M. A. (1999).** Hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Journal of cellular physiology* **181**, 188-202.
- Fernholz, D., Galle, P., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. & Will, H. (1993).** Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* **194**, 137-148.
- Foster, G. R., Ackrill, A. M., Goldin, R. D., Kerr, I. M., Thomas, H. C. & Stark, G. R. (1991).** Expression of the terminal protein region of hepatitis B virus inhibits cellular responses to interferons alpha and gamma and double-stranded RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 2888-2892.
- Foupouapouognigni, Y., Mba, S. A., Betsem a Betsem, E., Rousset, D., Froment, A., Gessain, A. & Njouom, R. (2011).** Hepatitis B and C virus infections in the three Pygmy groups in Cameroon. *Journal of clinical microbiology* **49**, 737-740.
- 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.
- Garcia, P., Ou, J., Rutter, W. & Walter, P. (1988).** Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage

- translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *Journal of Cellular Biology* **106**, 1093-1104.
- Garrigue, G., Merlin, M., Durand, J. P., Josse, R., Kollo, B., Trepo, C. & Bemba, D. K. (1985).** [Prevalence of markers of viral hepatitis B in northern Cameroon]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales* **78**, 883-889.
- Gautier-Hion A., C. M., Gautier JP. (1999).** Histoire naturelle des primates d'Afrique Centrale. In *ECOFAC*. Multipress Gabon.
- Gerner, P., Friedt, M., Oettinger, R., Lausch, E. & Wirth, S. (1998).** The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children. *Virology* **245**, 163-172.
- Glenn, J. S., Taylor, J. M. & White, J. M. (1990).** In vitro-synthesized hepatitis delta virus RNA initiates genome replication in cultured cells. *Journal of Virology* **64**, 3104-3107.
- Govindarajan, S. (1986).** Role of delta agent in fulminant B hepatitis. *Biomedical Pharmacother* **40**, 239-240.
- Govindarajan, S., De Cock, K. & Redeker, A. (1986a).** Natural course of delta superinfection in chronic hepatitis B virus-infected patients: histopathologic study with multiple liver biopsies. *Hepatology*: **6**, 640-644.
- Govindarajan, S., Valinluck, B. & Peters, L. (1986b).** Relapse of acute B viral hepatitis--role of delta agent. *Gut* **27**, 19-22.
- Grethe, S., Heckel, J.-O., Rietschel, W. & Hufert, F. T. (2000).** Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus Variants in Nonhuman Primates. *Journal of Virology* **74**, 5377-5381.
- Grethe, S., Monazahian, M., Bohme, I. & Thomssen, R. (1998).** Characterization of Unusual Escape Variants of Hepatitis B Virus Isolated from a Hepatitis B Surface Antigen-Negative Subject. *Journal of Virology* **72**, 7692-7696.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. (2010).** New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *System Biology* **59**, 307-321.
- Hadziyannis, S. (1995).** Viral hepatitis: an overview. *Journal of Virology*: **49**, 267-268.
- Hadziyannis, S. J., Tassopoulos, N. C., Heathcote, E. J., Chang, T. T., Kitis, G., Rizzetto, M., Marcellin, P., Lim, S. G., Goodman, Z., Wulfsohn, M. S., Xiong, S., Fry, J. &**

- Brosgart, C. L. (2003).** Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *The New England journal of medicine* **348**, 800-807.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985).** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular and Evolution* **22**, 160-174.
- Heidrich, B., Deterding, K., Tillmann, H., Raupach, R., Manns, M. & Wedemeyer, H. (2009).** Virological and clinical characteristics of delta hepatitis in Central Europe. *Journal of Viral Hepatology* **16**, 883-894.
- Hong, S.Y. & Chen, P.J. (2010).** Phosphorylation of Serine 177 of the Small Hepatitis Delta Antigen Regulates Viral Antigenomic RNA Replication by Interacting with the Processive RNA Polymerase II. *Journal of Virology* **84**, 3131-.
- Hsu, Y. S., Chien, R. N., Yeh, C. T., Sheen, I. S., Chiou, H. Y., Chu, C. M. & Liaw, Y. F. (2002).** Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*: **35**, 1522-1527.
- Hubschen, J. M., Mbah, P. O., Forbi, J. C., Otegbayo, J. A., Olinger, C. M., Charpentier, E. & Muller, C. P. (2011).** Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clinical microbiology and infection* : **17**, 88-94.
- Huy, T. T. T., Ngoc, T. T. & Abe, K. (2008).** New Complex Recombinant Genotype of Hepatitis B Virus Identified in Vietnam. *Journal of Virology*: **82**, 5657-5663.
- Hyams, K. C. (1995).** Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clinical infectious diseases : Infectious Diseases Society of America* **20**, 992-1000.
- Ikeda, K., Saitoh, S., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Tsubota, A., Koida, I., Arase, Y., Fukuda, M., Chayama, K., Murashima, N. & Kumada, H. (1998).** Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients. *Journal of hepatology* **28**, 930-938.
- Ireland, J., O'Donnell, B., Basuni, A., Kean, J., Wallace, L., Lau, G. & Carman, W. (2000).** Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology* **31**, 1176-1182.
- Ito, K., Tanaka, Y., Orito, E., Sugiyama, M., Fujiwara, K., Sugauchi, F., Kato, T., Tokita, H., Izumi, N., Kato, M., Yuen, M.-F., Lai, C.-L., Gish, R. G., Ueda, R. & Mizokami, M. (2006).** T1653 Mutation in the Box a Increases the Risk of Hepatocellular Carcinoma

- in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Genotype C Infection. *Clinical Infectious Diseases* **42**, 1-7.
- Jaw-Ching Wu, T.Y. C., Wei-Kei Schine, Sheng-Yung Wang, I-Jane Sheen, Yi-Hsiang Huang, Wan-Jr Syu (1999).** Recombination of Hepatitis D virus RNA sequences and its implications. *Molecular biology and Evolution* **16(11)**, 1622-1632.
- Kao, J.H., Chen, P.J., Lai, M.Y. & Chen, D.S. (2002).** Genotypes and Clinical Phenotypes of Hepatitis B Virus in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1207-1209.
- Kao, J. (2002).** Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *Journal of gastroenterology and hepatology* **17**, 643-650.
- Kao, J., Chen, P. & Chen, D. (2010).** Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiologic and molecular biological aspects. *Advanced Cancer Research* **108**, 21-72.
- Karayiannis, P., Alexopoulou, A., Hadziyannis, S., Thursz, M., Watts, R., Seito, S. & Thomas, H. (1995).** Fulminant hepatitis associated with hepatitis B virus e antigen-negative infection: importance of host factors. *Hepatology*: **22**, 1628-1634.
- Karin Kidd-Ljunggren, Y. M., Alistair H. Kidd (2002).** Genetic variability in hepatitis B viruses. *Journal of General Virology* **83**, 1267-1280.
- Kew, M. (1992).** Chronic hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Africa. *Journal of Virology* **88**, 21-72.
- Kfutwah, A. K., Tejiokem, M. C. & Njouom, R. (2012).** A low proportion of HBeAg among HBsAg-positive pregnant women with known HIV status could suggest low perinatal transmission of HBV in Cameroon. *Virology journal* **9**, 62.
- Khelifa, F. & Thibault, V. (2009).** [Characteristics of hepatitis B viral strains in chronic carrier patients from North-East Algeria]. *Pathologie-biologie* **57**, 107-113.
- Kimbi, G. C., Kramvis, A. & Kew, M. C. (2004).** Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *Journal of General Virology* **85**, 1211-1220.
- Kosaka, Y., Takase, K., Kojima, M., Shimizu, M., Inoue, K., Yoshida, M., Tanaka, S., Akahane, Y., Okamoto, H., Tsuda, F. & et al. (1991).** Fulminant hepatitis B: induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e antigen. *Gastroenterology* **100**, 1087-1094.

- Kouanfack, C., Aghokeng, A. F., Mondain, A. M., Bourgeois, A., Kenfack, A., Mpoudi-Ngole, E., Ducos, J., Delaporte, E. & Laurent, C. (2012).** Lamivudine-resistant HBV infection in HIV-positive patients receiving antiretroviral therapy in a public routine clinic in Cameroon. *Antiviral therapy* **17**, 321-326.
- Kowo, M. P., Goubau, P., Ndam, E. C., Njoya, O., Sasaki, S., Seghers, V. & Kesteloot, H. (1995).** Prevalence of hepatitis C virus and other blood-borne viruses in Pygmies and neighbouring Bantus in southern Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **89**, 484-486.
- Kramvis, A., Arakawa, K., Yu, M., Nogueira, R., Stram, D. & Kew, M. (2008).** Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *Journal of medical virology* **80**, 27-46.
- Kramvis, A. & Kew, M. (2007).** Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology Research*: **37**, S9-S19.
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., Fujiwara, K., Sugauchi, F., Mbanya, D., Zekeng, L., Ndemi, 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. *The Journal of general virology* **86**, 2047-2056.
- Kwiatkowski, R. W., Lyamichev, V., de Arruda, M. & Neri, B. (1999).** Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay. *Molecular diagnosis : a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology* **4**, 353-364.
- Lai, C., Leung, N., Teo, E., Tong, M., Wong, F., Hann, H., Han, S., Poynard, T., Myers, M., Chao, G., Lloyd, D. & Brown, N. (2005).** A 1-year trial of telbivudine, lamivudine, and the combination in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **129**, 528-536.
- Lambert, V., Fernholz, D., Sprengel, R., Fourel, I., Deleage, G., Wildner, G., Peyret, C., Trepo, C., Cova, L. & Will, H. (1990).** Virus-neutralizing monoclonal antibody to a conserved epitope on the duck hepatitis B virus pre-S protein. *Journal of Virology* **64**, 1290-1297.
- Lan, Y., Li, J., Liao, W. & Ou, J. (1999).** Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology* **259**, 342-348.

- Lau, D., Doo, E., Park, Y., Kleiner, D., Schmid, P., Kuhns, M. & Hoofnagle, J. (1999).** Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology*: **30**, 546-549.
- Laurent, C., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Kouanfack, C., Ciaffi, L., Nkoue, N., Mognutou, R., Calmy, A., Koulla-Shiro, S., Ducos, J. & Delaporte, E. (2010).** High rates of active hepatitis B and C co-infections in HIV-1 infected Cameroonian adults initiating antiretroviral therapy. *HIV medicine* **11**, 85-89.
- Lavanchy, D. (2004).** Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatology* **11**, 97-107.
- Le Gal, F., Gault, E., Ripault, M., Serpaggi, J., Trinchet, J., Gordien, E. & Deny, P. (2006).** Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerging infectious diseases* **12**, 1447-1450.
- Lee, W. M. (1997).** Hepatitis B virus infection. *The New England journal of medicine* **337**, 1733-1745.
- Li, Y.-J., Stallcup, M. R. & Lai, M. M. C. (2004).** Hepatitis Delta Virus Antigen Is Methylated at Arginine Residues, and Methylation Regulates Subcellular Localization and RNA Replication. *Journal of Virology* **78**, 13325-13334.
- Liao, W. & Ou, J. (1995).** Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *Journal of Virology* **69**, 1025-1029.
- Lin, C. & Kao, J. (2011).** The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *Journal of gastroenterology and hepatology* **26 Suppl 1**, 123-130.
- Liu, C., Kao, J., Chen, P., Lai, M. & Chen, D. (2002).** Molecular epidemiology of hepatitis B viral serotypes and genotypes in taiwan. *Journal Biomedical Society* **9**, 166-170.
- Lok, A. S. (2000).** Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *Journal of hepatology* **32**, 89-97.
- Lok, A. S., Lai, C. L., Wu, P. C., Leung, E. K. & Lam, T. S. (1987).** Spontaneous hepatitis B e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **92**, 1839-1843.
- Lok, A. S. & McMahon, B. J. (2001).** Chronic hepatitis B. *Hepatology*: **34**, 1225-1241.
- Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W. & Ray, S. C. (1999).** Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination. *Journal of Virology*: **73**, 152-160.

- Lu, X. & Block, T. (2004).** Study of the early steps of the Hepatitis B Virus life cycle. *Interne Journal of Medical Society*: **1**, 21-33.
- Lyons, S., Sharp, C., LeBreton, M., Djoko, C., Kiyang, J., Lankester, F., Bibila, T., Tamoufe, U., Fair, J., Wolfe, N. & Simmonds, P. (2012).** Species association of hepatitis B virus (HBV) in non-human apes; evidence for recombination between gorilla and chimpanzee variants. *PloS one* **7**, e33430.
- MacDonald, D. M., Holmes, E. C., Lewis, J. C. M. & Simmonds, P. (2000).** Detection of Hepatitis B Virus Infection in Wild-Born Chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): Phylogenetic Relationships with Human and Other Primate Genotypes. *Journal of Virology*: **74**, 4253-4257.
- Madejon, A., Cotonat, T., Bartolome, J., Castillo, I. & Carreno, V. (1994).** Treatment of chronic hepatitis D virus infection with low and high doses of interferon-alpha 2a: utility of polymerase chain reaction in monitoring antiviral response. *Hepatology*: **19**, 1331-1336.
- Magnius, L. & 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.
- Maini, M. K., Boni, C., Ogg, G. S., King, A. S., Reignat, S., Lee, C. K., Larrubia, J. R., Webster, G. J., McMichael, A. J., Ferrari, C., Williams, R., Vergani, D. & Bertolotti, A. (1999).** Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* **117**, 1386-1396.
- Makuwa, M., Souquiere, S., Bourry, O., Rouquet, P., Telfer, P., Mauclere, P., Kazanji, M., Roques, P. & Simon, F. (2007a).** Complete-genome analysis of hepatitis B virus from wild-born chimpanzees in central Africa demonstrates a strain-specific geographical cluster. *The Journal of general virology* **88**, 2679-2685.
- Makuwa, M., Souquiere, S., Bourry, O., Rouquet, P., Telfer, P., Mauclere, P., Kazanji, M., Roques, P. & Simon, F. (2007b).** Complete-genome analysis of hepatitis B virus from wild-born chimpanzees in central Africa demonstrates a strain-specific geographical cluster. *Journal of General Virology* **88**, 2679-2685.
- Makuwa, M., Souquiere, S., Telfer, P., Apetrei, C., Vray, M., Bedjabaga, I., Mouinga-Ondeme, A., Onanga, R., Marx, P. A., Kazanji, M., Roques, P. & Simon, F. (2006).**

- Identification of hepatitis B virus subgenotype A3 in rural Gabon. *Journal of medical virology* **78**, 1175-1184.
- Makuwa, M., Souquiere, S., Telfer, P., Leroy, E., Bourry, O., Rouquet, P., Clifford, S., Wickings, E., Roques, P. & Simon, F. (2003).** Occurrence of hepatitis viruses in wild-born non-human primates: a 3 year (1998-2001) epidemiological survey in Gabon. *Journal of medical primatology* **32**, 307-314.
- Marcellin, P., Chang, T. T., Lim, S. G., Tong, M. J., Sievert, W., Shiffman, M. L., Jeffers, L., Goodman, Z., Wulfsohn, M. S., Xiong, S., Fry, J. & Brosgart, C. L. (2003).** Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *The New England journal of medicine* **348**, 808-816.
- Maria Makuwa, A. M.-N., Sandrine Souquière, Dieudonné Nkoghé, Eric M. Leroy, and Mirdad Kazanji (2009).** Prevalence and Molecular Diversity of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus in Urban and Rural Population in Northern Gabon in Central Africa. *Journal of clinical microbiology* **47**, 2265-2268.
- Maria Makuwa, M. C., Sandrine Souquière, Gabriel Malonga-Mouelet, Antoine Mahé, and Mirdad Kazanji (2008).** Prevalence and Genetic Diversity of Hepatitis B and Delta Viruses in Pregnant Women in Gabon: Molecular Evidence that Hepatitis Delta Virus Clade 8 Originates from and is Endemic in Central Africa *Journal of clinical microbiology* **46**.
- Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H. & Robinson, W. S. (1980).** A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *PNAS* **77**, 2941-2945.
- Martinson, F. E. A., Weigle, K. A., Royce, R. A., Weber, D. J., Suchindran, C. M. & Lemon, S. M. (1998).** Risk Factors for Horizontal Transmission of Hepatitis B Virus in a Rural District in Ghana. *American Journal of Epidemiology* **147**, 478-487.
- Mbanya, D. N., Takam, D. & Ndumbe, P. M. (2003).** Serological findings amongst first-time blood donors in Yaounde, Cameroon: is safe donation a reality or a myth? *Transfusion medicine*: **13**, 267-273.
- McMahon, B. (2009).** The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatology Interne* **3**, 334-342.

- McMahon, B. J., Alberts, S. R., Wainwright, R. B., Bulkow, L. & Lanier, A. P. (1990).** Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. *Archives of internal medicine* **150**, 1051-1054.
- McMahon, B. J., Alward, W. L., Hall, D. B., Heyward, W. L., Bender, T. R., Francis, D. P. & Maynard, J. E. (1985).** Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *The Journal of infectious diseases* **151**, 599-603.
- Melegari, M., Bruno, S. & Wands, J. (1994).** Properties of hepatitis B virus pre-S1 deletion mutants. *Virology* **199**, 292-300.
- Michaels, M., Lanford, R., Demetris, A., Chavez, D., Brasky, K., Fung, J. & Starzl, T. (1996).** Lack of susceptibility of baboons to infection with hepatitis B virus. *Transplantation* **61**, 350-351.
- Michitaka, K., Tanaka, Y., Horiike, N., Duong, T., Chen, Y., Matsuura, K., Hiasa, Y., Mizokami, M. & Onji, M. (2006).** Tracing the history of hepatitis B virus genotype D in western Japan. *Journal of medical virology* **78**, 44-52.
- Milich, D. R., Chen, M. K., Hughes, J. L. & Jones, J. E. (1998).** The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *Journal of immunology* **160**, 2013-2021.
- Milich, D. R., Jones, J. E., Hughes, J. L., Price, J., Raney, A. K. & McLachlan, A. (1990).** Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6599-6603.
- Milich, D. R., Schodel, F., Hughes, J. L., Jones, J. E. & Peterson, D. L. (1997).** The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *Journal of virology* **71**, 2192-2201.
- Mizokami, M., Nakano, T., Orito, E., Tanaka, Y., Sakugawa, H., Mukaide, M. & Robertson, B. (1999).** Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Letter* **450**, 66-71.
- Mogtomo, M., Fomekong, S., Kuate, H. & Ngane, A. (2009).** [Screening of infectious microorganisms in blood banks in Douala (1995-2004)]. *Sante* **19**, 3-8.
- Mulders, M. N., Venard, V., Njayou, M., Edorh, A. P., Bola Oyefolu, A. O., Kehinde, M. O., Muyembe Tamfum, J. J., Nebie, Y. K., Maiga, I., Ammerlaan, W., Fack, F.,**

- Omilabu, S. A., Le Faou, A. & Muller, C. P. (2004).** Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *The Journal of infectious diseases* **190**, 400-408.
- Muroyama, R., Kato, N., Yoshida, H., Otsuka, M., Moriyama, M., Wang, Y., Shao, R., Dharel, N., Tanaka, Y., Ohta, M., Tateishi, R., Shiina, S., Tatsukawa, M., Fukai, K., Imazeki, F., Yokosuka, O., Shiratori, Y. & Omata, M. (2006).** Nucleotide change of codon 38 in the X gene of hepatitis B virus genotype C is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* **45**, 805-812.
- Naumann, H., Schaefer, S., Yoshida, C. F. T., Gaspar, A. M. C., Repp, R. & Gerlich, W. H. (1993).** Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *Journal of General Virology* **74**, 1627-1632.
- Ndumbe, P. M. (1991).** Hepatitis D in Yaounde, Cameroon. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **99**, 196-198.
- Ndumbe, P. M., Andela, A., Nkemnkeng-Asong, J., Watonsi, E. & Nyambi, P. (1992).** Prevalence of infections affecting the child among pregnant women in Yaounde, Cameroon. *Medical microbiology and immunology* **181**, 127-130.
- Ndumbe, P. M., Atchou, G., Biwole, M., Lobe, V. & Ayuk-Takem, J. (1993).** Infections among pygmies in the Eastern Province of Cameroon. *Medical microbiology and immunology* **182**, 281-284.
- Ndumbe, P. M. & Njie, T. K. (1989).** Hepatitis A and B infections in Yaounde, Cameroon. *Research in virology* **140**, 253-261.
- Ndumbe, P. M. & Nyouma, E. (1990).** Transmission of hepatitis B virus by blood transfusion in Yaounde, Cameroon. *Journal of Virology*: **301**, 523-524.
- Ndumbe, P. M., Skalsky, J. & Joller-Jemelka, H. I. (1994).** Seroprevalence of hepatitis and HIV infection among rural pregnant women in Cameroon. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **102**, 662-666.
- Niederrau, C., Heintges, T., Lange, S., Goldmann, G., Niederrau, C. M., Mohr, L. & Haussinger, D. (1996).** Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *The New England journal of medicine* **334**, 1422-1427.

- Niesters, H. G., Pas, S. & de Man, R. A. (2005).** Detection of hepatitis B virus genotypes and mutants: current status. *Journal of clinical virology* : **34 Suppl 1**, S4-8.
- Norder, H., Courouce, A. M. & Magnius, L. O. (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., Hammas, B., Lofdahl, S., Courouce, A.-M. & Magnius, L. O. (1992).** Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *Journal of General Virology*: **73**, 1201-1208.
- Nunez-Martinez, O., De la Cruz, G., De Diego, A., Molina, J., Rincon, D., Santos, L., Matilla, A., Banares, R., Salcedo, M., Calleja, J. & Clemente, G. (2003).** Liver transplantation for fulminant and subfulminant hepatic failure. *Transplantation Proceed* **35**, 1855-1856.
- Ogata, N., Miller, R., Ishak, K. & Purcell, R. (1993).** The complete nucleotide sequence of a pre-core mutant of hepatitis B virus implicated in fulminant hepatitis and its biological characterization in chimpanzees. *Virology* **194**, 263-276.
- Ohba, K., Mizokami, M., Ohno, T., Suzuki, K., Orito, E., Lau, J., Ina, Y., Ieko, K. & Gojobori, T. (1995).** Relationships between serotypes and genotypes of hepatitis B virus: genetic classification of HBV by use of surface genes. *Virus Research* **39**, 25-34.
- Okamoto, H., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1987a).** Site-directed mutagenesis of hepatitis B surface antigen sequence at codon 160 from arginine to lysine for conversion of subtypic determinant from r to w. *Biochemistry and Biophysics Research Community* **148**, 500-504.
- Okamoto, H., Imai, M., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1987b).** 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. *Journal of Virology*: **61**, 3030-3034.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1988).** Typing Hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes. *Journal of General Virology* **69**, 2575-2583.

- Olinger, C., Jutavijittum, P., Hubschen, J., Yousukh, A., Samounry, B., Thammavong, T., Toriyama, K. & Muller, C. (2008).** Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerging infectious diseases* **14**, 1777-1780.
- Olinger, C. M., Venard, V., Njayou, M., Oyefolu, A. O., Maiga, I., Kemp, A. J., Omilabu, S. A., le Faou, A. & Muller, C. P. (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. *The Journal of general virology* **87**, 1163-1173.
- Oon, C., Chen, W., Zhao, Y., Teng, S. & Leong, A. (1999).** Detection of hepatitis B surface antigen mutants and their integration in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letter* **136**, 95-99.
- Osiowy, C., Giles, E., Tanaka, Y., Mizokami, M. & Minuk, G. Y. (2006).** Molecular Evolution of Hepatitis B Virus over 25 Years. *Journal of Virology*: **80**, 10307-10314.
- Ou, J. H., Yeh, C. T. & Yen, T. S. (1989).** Transport of hepatitis B virus precore protein into the nucleus after cleavage of its signal peptide. *Journal of Virology*: **63**, 5238-5243.
- Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., MacKay, P., Leadbetter, G. & Murray, K. (1979).** Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* **282**, 575-579.
- Perriere, G. & Gouy, M. (1996).** WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* **78**, 364-369.
- Perrillo, R., Schiff, E., Yoshida, E., Statler, A., Hirsch, K., Wright, T., Gutfreund, K., Lamy, P. & Murray, A. (2000).** Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepatology* **32**, 129-134.
- Phung, T., Alestig, E., Nguyen, T., Hannoun, C. & Lindh, M. (2010).** Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam--genotypes B4 and C1 predominate. *Journal of medical virology* **82**, 1327-1333.
- Poovorawan, Y., Chongsrisawat, V., Theamboonlers, A., Vimolkeij, L. & Yano, M. (1997).** Is there evidence for intrauterine HBV infection in newborns of hepatitis B carrier mothers? *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **28**, 365-369.
- Poveda, J. D., Delord, B., Chancerel, B., Bailly, C., Merlin, M., Le Bras, M. & Fleury, H. J. (1986).** [Carriage of HBs antigen and infection by delta agent in Cameroon]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales* **79**, 785-787.

- Prince, A. M. (1968).** An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *PNAS* **60**, 814-821.
- Radjef, N., Gordien, E., Ivaniushina, V., Gault, E., Anais, P., Drugan, T., Trinchet, J.C., Roulot, D., Tamby, M., Milinkovitch, M. C. & Deny, P. (2004).** Molecular Phylogenetic Analyses Indicate a Wide and Ancient Radiation of African Hepatitis Delta Virus, Suggesting a Deltavirus Genus of at Least Seven Major Clades. *Journal of Virology*: **78**, 2537-2544.
- Ranger-Rogez, S., Alain, S. & Denis, F. (2002).** [Hepatitis viruses: mother to child transmission]. *Pathologie-biologie* **50**, 568-575.
- Rapicetta, M., Stroffolini, T., Ngatchu, T., Chionne, P., Ciccaglione, A. R., Lantum, D. & Chiaramonte, M. (1991).** Age- and sex-related study of HBV-DNA in HBsAg asymptomatic children from an endemic area (Cameroon). *Annals of tropical paediatrics* **11**, 325-329.
- Rehermann, B., Fowler, P., Sidney, J., Person, J., Redeker, A., Brown, M., Moss, B., Sette, A. & Chisari, F. V. (1995a).** The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *The Journal of experimental medicine* **181**, 1047-1058.
- Rehermann, B., Pasquinelli, C., Mosier, S. M. & Chisari, F. V. (1995b).** Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection. *The Journal of clinical investigation* **96**, 1527-1534.
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F. & 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, J. & Gerin, J. (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. *Journal of Immunology*: **125**, 318-324.
- Sanchez-Tapias, J. M., Vilar, J. H., Costa, J., Bruguera, M., Ballesta, A. M. & Rodes, J. (1985).** Natural history of chronic persistent hepatitis B. Relationship between hepatitis B virus replication and the course of the disease. *Journal of hepatology* **1**, 15-27.
- Santantonio, T., Jung, M., Schneider, R., Fernholz, D., Milella, M., Monno, L., Pastore, G., Pape, G. & Will, H. (1992).** Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2

- proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology* **188**, 948-952.
- Seeger, C. & Mason, W. S. (2000).** Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology Molecular Biology Review* **64**, 51-68.
- Sheen, I. S., Liaw, Y. F., Tai, D. I. & Chu, C. M. (1985).** Hepatic decompensation associated with hepatitis B e antigen clearance in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* **89**, 732-735.
- Sheldon, J., Camino, N., Rodes, B., Bartholomeusz, A., Kuiper, M., Tacke, F., Nunez, M., Mauss, S., Lutz, T., Klausen, G., Locarnini, S. & Soriano, V. (2005).** Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antiviral therapy* **10**, 727-734.
- Shih, H. H., Shih, C., Wang, H.W., Su, C.-W., Sheen, I.J. & Wu, J.C. (2010).** Pro-205 of large hepatitis delta antigen and Pro-62 of major hepatitis B surface antigen influence the assembly of different genotypes of hepatitis D virus. *Journal of General Virology*: **91**, 1004-1012.
- Simmonds, P. & Midgley, S. (2005).** Recombination in the Genesis and Evolution of Hepatitis B Virus Genotypes. *Journal of Virology*: **79**, 15467-15476.
- Sirma, H., Giannini, C., Poussin, K., Paterlini, P., Kremsdorf, D. & Brechot, 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.
- Sirma, H., Weil, R., Rosmorduc, O., Urban, S., Israel, A., Kremsdorf, D. & Brechot, C. (1998).** Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* **16**, 2051-2063.
- Sobao, Y., Tomiyama, H., Sugi, K., Tokunaga, M., Ueno, T., Saito, S., Fujiyama, S., Morimoto, M., Tanaka, K. & Takiguchi, M. (2002).** The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication. *Journal of hepatology* **36**, 105-115.
- Starkman, S., MacDonald, D., Lewis, J., Holmes, E. & Simmonds, P. (2003).** Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology* **314**, 381-393.

- Stemler, M., Weimer, T., Tu, Z. X., Wan, D. F., Levrero, M., Jung, C., Pape, G. R. & Will, H. (1990).** Mapping of B-cell epitopes of the human hepatitis B virus X protein. *Journal of Virology*: **64**, 2802-2809.
- Stephan Urban, A. S., Mauria Dandri, Joerg Petersen (2010).** The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of hepatology* **52**, 282-284.
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R. F. & Rossau, R. (2000).** A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* **81**, 67-74.
- Sugauchi, F., Kumada, H., Acharya, S. A., Shrestha, S. M., Gamutan, M. T. A., Khan, M., Gish, R. G., Tanaka, Y., Kato, T., Orito, E., Ueda, R., Miyakawa, Y. & Mizokami, M. (2004a).** Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *Journal of General Virology* **85**, 811-820.
- Sugauchi, F., Kumada, H., Sakugawa, H., Komatsu, M., Niitsuma, H., Watanabe, H., Akahane, Y., Tokita, H., Kato, T., Tanaka, Y., Orito, E., Ueda, R., Miyakawa, Y. & Mizokami, M. (2004b).** Two Subtypes of Genotype B (Ba and Bj) of Hepatitis B Virus in Japan. *Clinical Infectious Diseases* **38**, 1222-1228.
- Summers, J., Smolec, J. M. & Snyder, R. (1978).** A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *PNAS* **75**, 4533-4537.
- Tai, P. C., Suk, F. M., Gerlich, W. H., Neurath, A. R. & Shih, C. (2002).** Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. *Virology* **292**, 44-58.
- Takahashi, K., Akahane, Y., Hino, K., Ohta, Y. & Mishiro, S. (1998).** Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virology* **143**, 2313-2326.
- Takahashi, K., Brotman, B., Usuda, S., Mishiro, S. & Prince, A. (2000).** Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* **267**, 58-64.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739.

- Tanaka, Y., Hasegawa, I., Kato, T., Orito, E., Hirashima, N., Acharya, S., Gish, R., Kramvis, A., Kew, M., Yoshihara, N., Shrestha, S., Khan, M., Miyakawa, Y. & Mizokami, M. (2004).** A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology*: **40**, 747-755.
- Tatematsu, K., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Sugauchi, F., Mano, S., Maeshiro, T., Nakayoshi, T., Wakuta, M., Miyakawa, Y. & Mizokami, M. (2009).** A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. *Journal of Virology*: **83**, 10538-10547.
- Taylor, J. (2006).** Structure and replication of hepatitis delta virus RNA. *Current Top Microbiology and Immunology* **307**, 1-23.
- Thomas, H. C., Karayiannis, P. & Brook, G. (1991).** Treatment of hepatitis B virus infection with interferon. Factors predicting response to interferon. *Journal of hepatology* **13 Suppl 1**, S4-7.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- Tine, 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. *Journal of hepatology* **18**, 154-162.
- Tiollais, P., Pourcel, C. & Dejean, A. (1985).** The hepatitis B virus. *Nature* **317**, 489-495.
- Torresi, J., Earnest-Silveira, L., Deliyannis, G., Edgton, K., Zhuang, H., Locarnini, S., Fyfe, J., Sozzi, T. & Jackson, D. (2002).** Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* **293**, 305-313.
- Tsai, J. F., Jeng, J. E., Ho, M. S., Chang, W. Y., Hsieh, M. Y., Lin, Z. Y. & Tsai, J. H. (1997).** Effect of hepatitis C and B virus infection on risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *British journal of cancer* **76**, 968-974.
- Tseng, C.H., Cheng, T.S., Shu, C.Y., Jeng, K.S. & Lai, M. M. C. (2010).** Modification of Small Hepatitis Delta Virus Antigen by SUMO Protein. *Journal of Virology*: **84**, 918-927.

- Uchida, T., Saitoh, T. & Shinzawa, H. (1997).** Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications. *Pathology Interne* **47**, 183-193.
- Usuda, S., Okamoto, H., Iwanari, H., Baba, K., Tsuda, F., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1999).** Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *Journal of Virology Methods* **80**, 97-112.
- Vaudin, M., Wolstenholme, A. J., Tsiquaye, K. N., Zuckerman, A. J. & Harrison, T. J. (1988).** The Complete Nucleotide Sequence of the Genome of a Hepatitis B Virus Isolated from a Naturally Infected Chimpanzee. *Journal of General Virology* **69**, 1383-1389.
- Villeneuve, J., Durantel, D., Durantel, S., Westland, C., Xiong, S., Brosgart, C., Gibbs, C., Parvaz, P., Werle, B., Trepo, C. & Zoulim, F. (2003).** Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *Journal of hepatology* **39**, 1085-1089.
- Wang, C. J., Chen, P. J., Wu, J. C., Patel, D. & Chen, D. S. (1991).** Small-form hepatitis B surface antigen is sufficient to help in the assembly of hepatitis delta virus-like particles. *Journal of Virology*:**65**, 6630-6636.
- Waters, J. A., Kennedy, M., Voet, P., Hauser, P., Petre, J., Carman, W. & Thomas, H. C. (1992).** Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *The Journal of clinical investigation* **90**, 2543-2547.
- Whitten, T. M., Quets, A. T. & Schloemer, R. H. (1991).** Identification of the hepatitis B virus factor that inhibits expression of the beta interferon gene. *Journal of virology* **65**, 4699-4704.
- WHO (2004).** Hepatitis B Vaccines. *Weekly Epidemiology Record* **79**.
- Wu, C. G., Forgues, M., Siddique, S., Farnsworth, J., Valerie, K. & Wang, X. W. (2002).** SAGE transcript profiles of normal primary human hepatocytes expressing oncogenic hepatitis B virus X protein. *FASEB journal : American Societies for Experimental Biology* **16**, 1665-1667.
- Wynne, S., Crowther, R. & Leslie, A. (1999a).** The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Molecular and Cellular* **3**, 771-780.

- Wynne, S., Leslie, A., Butler, P. & Crowther, R. (1999b).** Crystallization of hepatitis B virus core protein shells: determination of cryoprotectant conditions and preliminary X-ray characterization. *Biology Crystallography* **55**, 557-560.
- Xia, Y. P., Yeh, C. T., Ou, J. H. & Lai, M. M. (1992).** Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex. *Journal of Virology*: **66**, 914-921.
- Xu, Z., Jensen, G. & Yen, T. S. (1997).** Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *Journal of virology* **71**, 7387-7392.
- Yamaguchi, Y., Filipovska, J., Yano, K., Furuya, A., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., Sugimoto, S., Konarska, M. M. & Handa, H. (2001).** Stimulation of RNA Polymerase II Elongation by Hepatitis Delta Antigen. *Science* **293**, 124-127.
- Yang, J., Xing, K., Deng, R., Wang, J. & Wang, X. (2006).** Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing. *Journal of General Virology*: **87**, 2203-2215.
- Yeh, C. T. (2000).** Hepatitis B virus X protein: searching for a role in hepatocarcinogenesis. *Journal of gastroenterology and hepatology* **15**, 339-341.
- Yoffe, B., Burns, D. K., Bhatt, H. S. & Combes, B. (1990).** Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection. *Hepatology*: **12**, 187-192.
- Zanetti, A., Tanzi, E., Manzillo, G., Maio, G., Sbriglia, C., Caporaso, N., Thomas, H. & Zuckerman, A. (1988).** Hepatitis B variant in Europe. *Lancet* **2**, 1132-1133.
- Zekeng, L. & Kaptue, L. (1990).** [HIV-1 serology and carrier state for HBs and HBe in blood donors at Yaounde University Hospital Center, Cameroon]. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale* **70**, 49-53.
- Zhevachevsky, N., Nomokonova, N., Beklemishev, A. & Belov, G. (2000).** Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: diagnostic and epidemiological significance. *Journal of medical virology* **61**, 433-438.
- Zoufaly, A., Onyoh, E. F., Tih, P. M., Awasom, C. N. & Feldt, T. (2012).** High prevalence of hepatitis B and syphilis co-infections among HIV patients initiating antiretroviral therapy in the north-west region of Cameroon. *International journal of STD & AIDS* **23**, 435-438.
- Zoulim, F. (2002).** Assessing hepatitis B virus resistance in vitro and molecular mechanisms of nucleoside resistance. *Seminars in liver disease* **22 Suppl 1**, 23-31.

ANNEXES

Annexe 1



Short communication

Detection and characterization of hepatitis B virus strains from wild-caught gorillas and chimpanzees in Cameroon, Central Africa

Richard Njouom^{*}, Serge Alain Sadeuh Mba, Eric Nerrienet¹, Yacouba Foupouapouognigni, Dominique Rousset²

Laboratoire de Virologie, Centre Pasteur du Cameroun, Yaounde, Cameroon

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 December 2009
Received in revised form 4 May 2010
Accepted 7 May 2010
Available online 13 May 2010

Keywords:
HBV
Gorillas
Chimpanzees
Cameroon
Central Africa

ABSTRACT

Previous epidemiological studies have reported a high prevalence of hepatitis B virus (HBV) infection in chimpanzees in Gabon and Congo, Central Africa. There is no data for this species from Cameroon. To date few cases of active HBV infection have been documented in gorillas and only one complete HBV sequence has been described from a wild-caught gorilla originating from Cameroon and housed in Germany. Since gorillas are apes found in Cameroon, we thus investigated the prevalence and genetic relationships of HBV infecting apes in this area. We subjected 185 wild-caught apes' plasmas, including 159 from chimpanzees and 26 from gorillas to ELISA screening for HBV surface antigen (HBsAg). Subsequently, we detected HBV DNA, sequenced the whole HBV genome and performed phylogenetic analysis. Eleven (6.9%) chimpanzees and 3 (11.6%) gorillas plasma were found HBsAg positive, of which 8 and 3 were positive for HBV DNA, respectively. Phylogenetic analyses revealed that the 3 new gorilla HBV sequences grouped together with the single available HBV sequence from gorilla. Evidence of recombination between HBV *Pan troglodytes troglodytes* and *Pan troglodytes vellerosus* was observed in two of the Cameroonian strains. Findings from our study show that HBV infection is endemic in wild-born gorillas and chimpanzees in Cameroon, and that there is evidence of recombination between HBV strains circulating in chimpanzees. We demonstrated the existence of gorillas' specific HBV strains distinct but related to those found in chimpanzees living in the same habitat in Cameroon, providing substantial evidence of species association of HBV in NHPs.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infection represents a worldwide health problem, affecting approximately one-third of the world's human population and accounting for approximately 1 million of death from chronic liver disease and hepatocellular carcinoma each year. Human populations in South-East Asia, sub-Saharan Africa and Central and South America show particularly high frequencies of HBV infection. HBV infection has also been documented in non-human primates (NHPs) (Robertson and Margolis, 2002) including chimpanzees (MacDonald et al., 2000; Takahashi et al., 2000) and

gorillas (Makuwa et al., 2006; Starkman et al., 2003) in sub-Saharan Africa; gibbons and orangutans in South-East Asia (Sanguanmoo et al., 2008; Starkman et al., 2003). A new highly divergent hepadnavirus distantly related to human HBV groups was isolated from the brown woolly monkey *Lagothrix lagotricha*, a New World primate in South America (Lanford et al., 1998).

Despite they are living in the same geographical areas, HBV variants infecting great apes and humans in Central Africa and South East Asia are genetically distinct from each other in general, providing evidence for the existence of separate indigenous virus populations. Although there is currently no evidence that human populations have been or are infected with great apes-associated HBV variants, the existence of this NHPs reservoir of HBV could represent a handicap for the eradication of human HBV infection. It is therefore necessary in endemic areas to document the prevalence of HBV infection in human and NHPs populations.

Previous epidemiological studies have reported a high prevalence of HBV infection in great apes comparable to human populations in Gabon and Congo (Makuwa et al., 2006). To date documented cases of active HBV infection are rare in gorillas and only one complete HBV sequence has been described from a wild-caught gorilla originating from Cameroon and housed in Germany

^{*} Corresponding author at: Service de virologie, Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274 Yaounde, Cameroon. Tel.: +237 22 23 10 15/79 87 36 04; fax: +237 22 23 15 64.

E-mail addresses: njouom@pasteur-yaounde.org, njouom@yahoo.com (R. Njouom).

¹ Present address: HIV and Hepatitis Unit, Institut Pasteur, Phnom Penh, Cambodia.

² Address: Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN (URA3015 CNRS), Centre National de Référence de la Grippe (Région Nord), Institut Pasteur, Paris, France.

(Grethe et al., 2000). The HBV sequence harboured by that western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) showed a particular position within the chimpanzee HBV clade. Cameroon, as most sub-Saharan African countries, is located in the endemic area with hepatitis B surface antigen (HBsAg) prevalences ranging above 8% in humans according to the population studied (Chiaramonte et al., 1991; Garrigue et al., 1985; Mbanya et al., 2001; Ndumbe and Njie, 1989; Zekeng and Kaptue, 1990). No information is available about the prevalence of HBV infection in ape populations in Cameroon. We thus searched for HBV infection in plasmas sampled from wild-caught chimpanzees and gorillas originating from this country. In addition, we sequenced the complete genome of HBV isolated from the HBV positive plasma and performed a phylogenetic analysis to investigate their genetic relatedness to the previously identified HBV strains from human and apes.

2. Materials and methods

Plasma samples from 185 apes including 159 chimpanzees and 26 gorillas were available for screening. These samples were collected from 1997 to 2006 from wild-born orphaned apes living mainly in Southern rain forest areas of Cameroon. These animals have been translocated to zoos or rescue centres, generally after their mother had been killed by hunters. At their arrival, they were put into quarantine and sampled for routine veterinary screenings, including HBV detection. This screening was performed to know its serological status in the wild before any contact with the other animals in the centre. Healthy animals were then integrated in their specific community. Plasmas collected on EDTA tubes were sent to the Centre Pasteur of Cameroon (CPC). The subspecies origin of chimpanzees was determined by mitochondrial DNA (mtDNA) analysis as described previously (Nerrienet et al., 2005).

The presence of HBV surface antigen (HBsAg) was assessed using the commercial ELISA, Monolisa AgHBs Plus (Biorad, Marnes la Coquette, France). The assay was performed according to the manufacturer instructions.

DNA was extracted from 200 μ L HBsAg-positive plasma using QIAamp[®] DNA Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and HBV DNA was detected by nested PCR amplification of a 415-bp fragment of the S gene using two sets of primers (S1/S24 for the first round PCR and S3/S23 for the second round PCR) (Starkman et al., 2003).

To further characterize the HBV variants infecting HBV DNA-positive apes, we used previously described sets of nested primers (MacDonald et al., 2000) to obtain overlapping sub-genomic segments, spanning the complete genome. The amplification strategy as well as primers combinations are described elsewhere (Sall et al., 2005). Nucleotide sequencing was carried out directly on second-round amplification products by using an ABI BigDye kit (Applied Biosystems). Surface and complete genome sequences were aligned with previously published HBV sequences by using CLUSTAL X v1.81 software program (Thompson et al., 1997) and imported into PhyML 3.0 software (Guindon and Gascuel, 2003) to perform phylogenetic analysis. Sequences comprised two representative HBV sequences of human genotypes A–H and NHP HBV sequences from chimpanzees ($n=16$), gorilla, gibbon species ($n=3$), orangutan ($n=2$) and the woolly monkey (GenBank accession numbers are shown in Fig. 1A). Phylogenetic trees were constructed by Maximum Likelihood method. Bootstrapping with 100 replicates of heuristic searches tested the confidence of the tree. All the five complete genome sequences were examined for the presence of recombination with other HBV genotypes, as described previously (Robertson et al., 1995). Bootscan analysis implemented in the SimPlot software program (Lole et al., 1999) was performed for each of the strains.

3. Results

HBsAg was detected in 14 (7.6%) out of 185 apes plasmas. The HBsAg prevalence seems to be heterogeneous according to ape's species, however the difference was not statistically significant: 6.9% (11/159) in chimpanzees and 11.5% (3/26) in gorillas ($p=0.67$).

As results of PCR assays for HBV-DNA amplification, 8/11 (72.7%) HBsAg-positive chimpanzees' plasmas and all three HBsAg-positive gorillas' plasmas showed a positive PCR result for surface (S) gene amplification. Phylogenetic analysis using the sequences of the 415-bp S gene fragment detected showed that all the S gene sequences identified from the HBV-infected chimpanzees grouped consistently with other previously published sequences in a unique clade. Within the divergent clade of chimpanzee sequences, individual sequences clustered into three distinct groups, with a strong association with subspecies. The three new HBV partial sequences from gorillas fell into a specific group including the reference strain (AJ131567) (Fig. 1A).

To confirm this phylogenetic analysis, HBV DNA isolates from all the three *Gorilla gorilla* individuals (ggcam19, ggcam7 and ggcam22), one *Pan troglodytes troglodytes* individual (cpzcam17) and one *Pan troglodytes vellerosus* individual (cpzcam6) were chosen for complete genome amplification. We obtained a successful amplification of complete HBV genome of these strains. Each of the five HBV sequences was 3182-bp in length and co-linear with the previously published chimpanzee and gorilla HBV sequences. The results showed that the three gorillas' sequences were 99.3–99.9% identical and 93.8–95.3% between chimpanzee and gorilla sequences. Comparison between chimpanzee or gorilla group and other apes or human sequences showed less than 92% identity (data not shown). By phylogenetic analysis, clear clusters were observed according to the HBV host species: one for each human genomic group (A–H), one for gibbon strains and one for orangutan strains, all distinct from the group of the chimpanzee/gorilla HBV sequences. All the complete genome sequences obtained from the five Cameroonian HBV positive apes fell into the chimpanzee/gorilla HBV group (ChHBV) (Fig. 1B). Within this group, HBV sequence from cpzcam17, the Cameroonian *P. t. troglodytes* individual, fell in the cluster of HBV sequences reported from chimpanzees subspecies. Similarly, HBV sequences from cpzcam6 also group together with previously characterized HBV isolate from chimpanzee *P. t. vellerosus*. All three HBV sequences obtained from the Cameroonian gorillas clustered together with the unique reported HBV sequence from gorilla in the chimpanzee/gorilla HBV group.

To better appreciate the similarity of these five HBV strains, amino acid (aa) sequences were deduced from S gene and aligned with previously published chimpanzee, gorilla, and human HBV S antigen sequences. As had already been established (Starkman et al., 2003), all the 5 chimpanzee and gorilla S antigen sequences exhibited a deletion of 11 aa at the N-terminal region of the pre-S1 domain. Furthermore, two aa of the pre-S1 domain were found to be specific to gorilla (I85 and K104) whereas in pre-S2 domain, there was no aa specific to gorillas. Finally in the S domain, the aa T301 was specific to gorilla (Fig. 2).

Evidence of recombination between HBV *P. t. troglodytes* and *P. t. vellerosus* was observed in two of the Cameroonian strains (cpzcam17 and cpzcam6). The result of the bootscan analysis for the complete genome sequence of these strains is presented in Fig. 3A and B. The phylogenetic tree constructed using the corresponding sequence segment confirmed the grouping of the cpzcam17 (*P. t. troglodytes*) and cpzcam6 (*P. t. vellerosus*) strains together with the *P. t. vellerosus* and *P. t. troglodytes* strains, respectively with strong bootstrap support (Fig. 3C and D). The recombinant segment corresponded to a part of the non-overlapping HBV DNA polymerase gene. The breakpoint seems to be located at nucleotide positions 700 and 1300 (Fig. 3A and B).

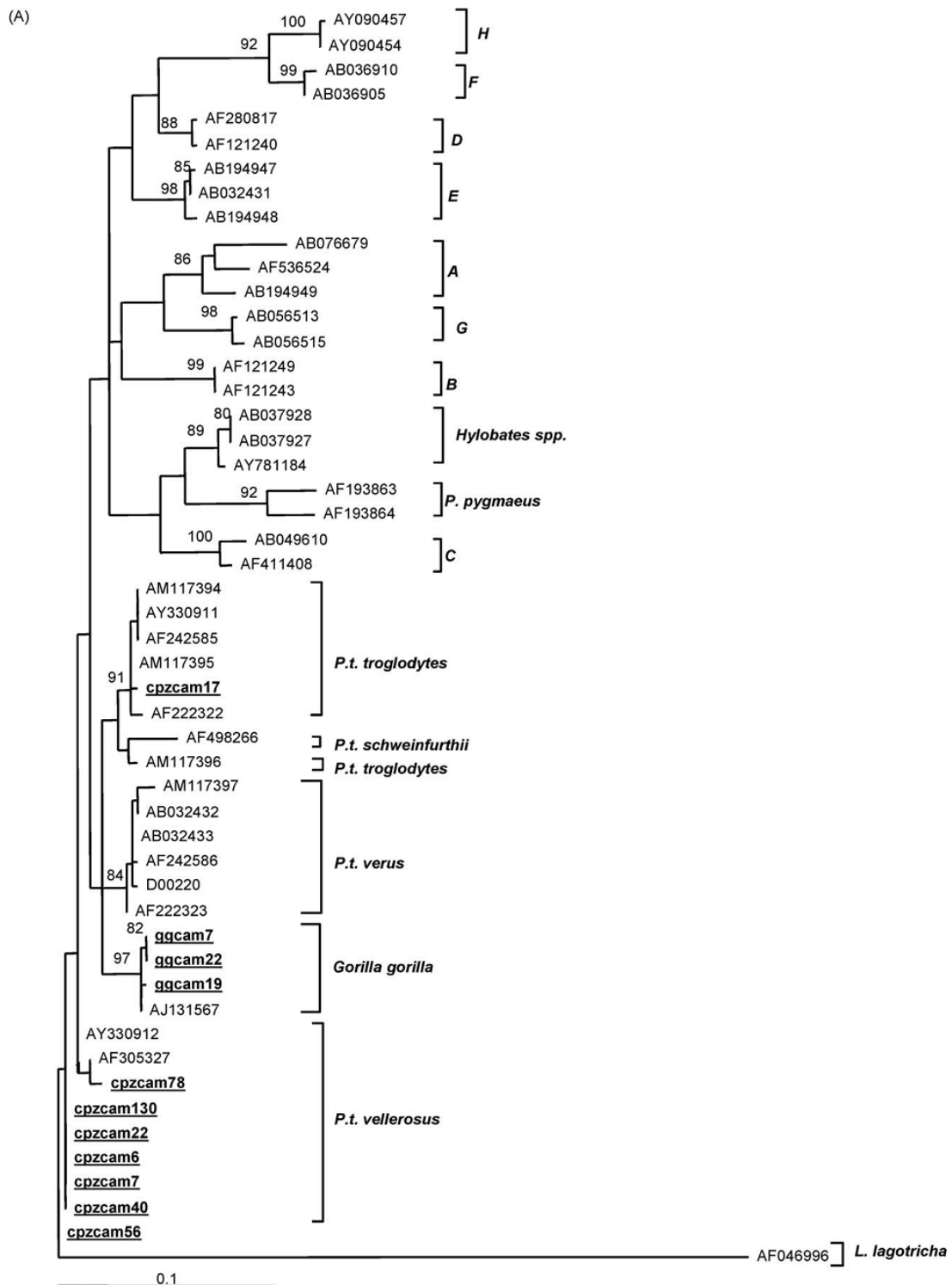


Fig. 1. Phylogram depicting the phylogenetic ML tree of the partial surface gene (415-bp) sequences (A) and the complete genome sequences (B) obtained from this study and representative sequences of human and non-human HBV strains from GenBank. Sequences from this study are in bold and underlined. Percentage bootstrap values (>70%) were shown at the respective nodes. All sequences were submitted to GenBank with the accession numbers from FJ798100 to FJ798105 for surface gene sequences and from FJ798095 to FJ798099 for complete gene sequences.

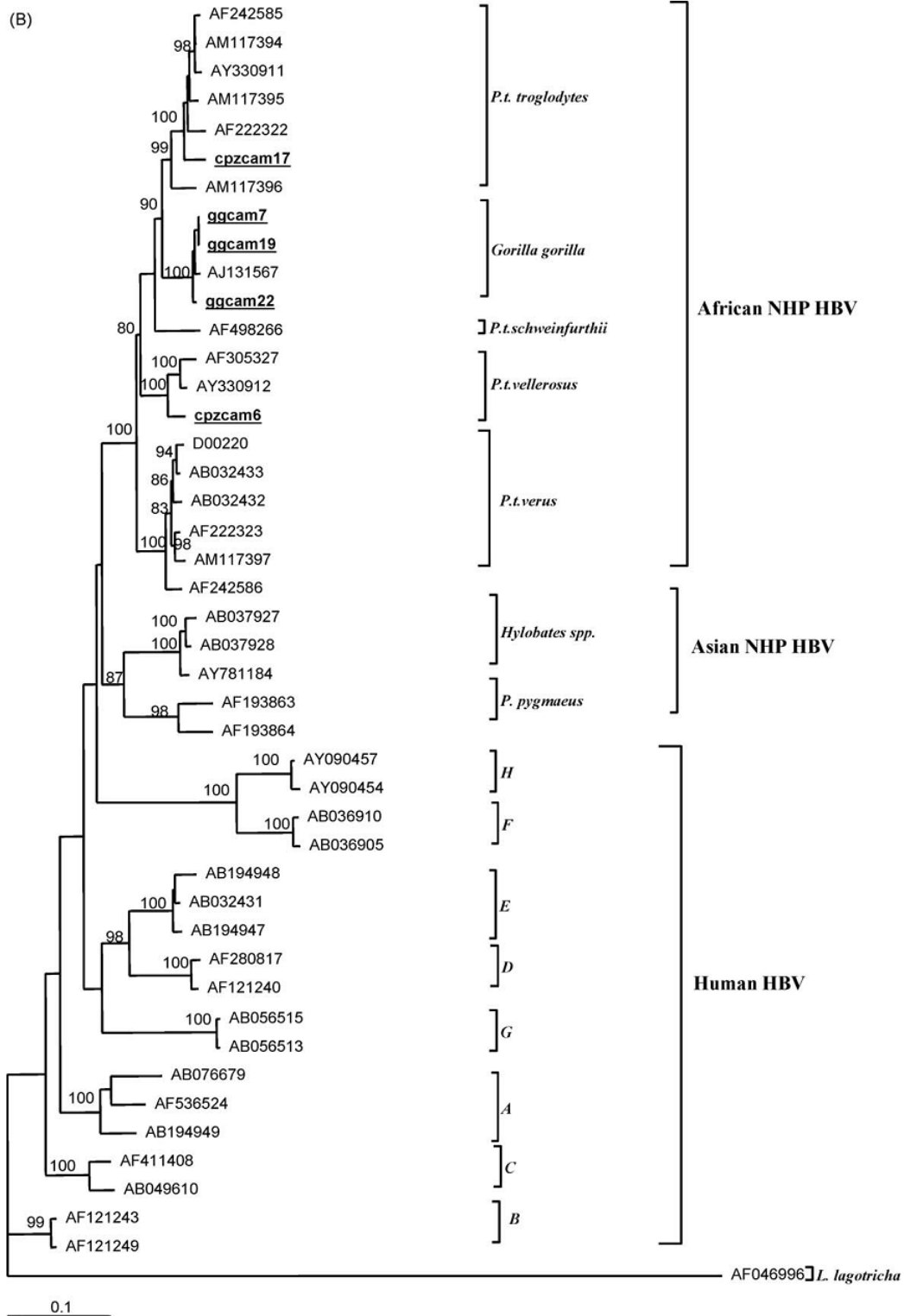


Fig. 1. (Continued).

(A)
	75 85 95 105 115
AB194949-A3	LGWSPQ AQQILTTVPA VPPASTNRQSGRQPTPIISP PLRDSHPQA
AB194947-E M.KML. D. T. T.
AJ131567-GG I. N. K. T.
<u>ggcam19-GG</u> I. N. K. T.
<u>ggcam7-GG</u> I. N. K. T.
<u>ggcam22-GG</u> I. N. K. T.
AF242585-Ptt	. . . S. . . K. . . . N. P. T.
AY330911-Ptt	. . . S. . . K. . . . N. P. T.
AM117394-Ptt	. . . S. . . K. . . . N. P. T.
AM117395-Ptt	. . . S. . . K. . . T N. P. T.
<u>cpzcam17-Ptt</u>	. . . S. . . K. . . . N. P. T.
AF305327-Ptv1 L.I N. H. . . M. T.
AY330912-Ptv1 L.I N. H. T.
<u>cpzcam6-Ptv1</u> L.I N. H. T.
AF498266-Pts N. T.
AB032433-Ptv L. N. L. T.
AB032432-Ptv L. N. L. T.
AM117397-Ptv L. N. L. T.
AF242586-Ptv L. N. L. T.

(B)
	305 315 325 335 345
AB194949-A3	PAQGNSMFPS CCCTKPTDGN CTCIPISSW AFAKYLWEWA SVRFS
AB194947-E	. . . T. S. . . S. G. F. A.
AJ131567-GG	T. . . T. LY. S. F.
<u>ggcam19-GG</u>	T. . . T. LY. S. F.
<u>ggcam7-GG</u>	T. . . T. LY. S. F.
<u>ggcam22-GG</u>	T. . . T. LY. S. F.
AF242585-Ptt	. . . T. LL. S. X. V. F.
AY330911-Ptt	. . . T. LL. S. V. F.
AM117394-Ptt	. . . T. LL. S. V. F.
AM117395-Ptt	. . . T. LL. S. V. F.
<u>cpzcam17-Ptt</u>	. . . T. LL. S. V. F.
AF305327-Ptv1	. . . T. L. S. F.
AY330912-Ptv1	. . . T. L. S. F.
<u>cpzcam6-Ptv1</u>	. . . T. L. S. F.
AF498266-Pts	. . H. T. S. R. F.
AB032433-Ptv	. . . T. LI. S. F.
AB032432-Ptv	. . . T. LI. S. F.
AM117397-Ptv	. . . T. LI. S. F.
AF242586-Ptv	. . . T. LI. S. F.

Fig. 2. Alignment of amino acid sequences of the fragment of Pre-S1 domain (A) and fragment of S domain (B) from the two chimpanzee HBV isolates (cpzcam17 and cpzcam6) and the three gorilla HBV isolates (ggcam19, ggcam7 and ggcam22) with previously reported chimpanzee and gorilla HBV sequences and with human HBV genotype A3 (accession number AB194949) and E (accession number AB194947). Dots indicated conserved amino acids. Dashes indicated deleted amino acids. Changing amino acids were indicated in letters. A master sequence based on the comparison was shown in the upper line. Ptt: *Pan troglodytes troglodytes*; Pts: *Pan troglodytes schweinfurthii*; Ptv1: *Pan troglodytes vellerosus*; Ptv: *Pan troglodytes verus*; GG: *Gorilla gorilla*.

4. Discussion

In this study, a large number of great apes plasmas from Cameroon were screened for HBsAg and HBV-DNA. The prevalence of HBV infection was about 7% in chimpanzees and 12% in gorillas. This study confirms, as reported by other authors (MacDonald et al., 2000; Makuwa et al., 2006; Starkman et al., 2003), the presence of HBV in great apes (chimpanzees and gorilla) in Cameroon. Here we report a frequent HBV infection in wild-caught chimpanzees and gorillas from Cameroon with prevalence of

HBsAg and HBV DNA remarkably similar to that observed in the Cameroonian human population (>8%) (Chiaromonte et al., 1991; Garrigue et al., 1985; Mbanya et al., 2001; Ndumbe and Njie, 1989; Zekeng and Kaptue, 1990).

The current study provides five new complete HBV genomes from two chimpanzees and three gorillas born in the wild. The phylogenetic tree comparing these five HBV sequences with other previously reported HBV sequences from primates showed that HBV sequences recovered from great apes in Africa (chimpanzees and gorillas) and HBV sequences reported in great apes in Asia

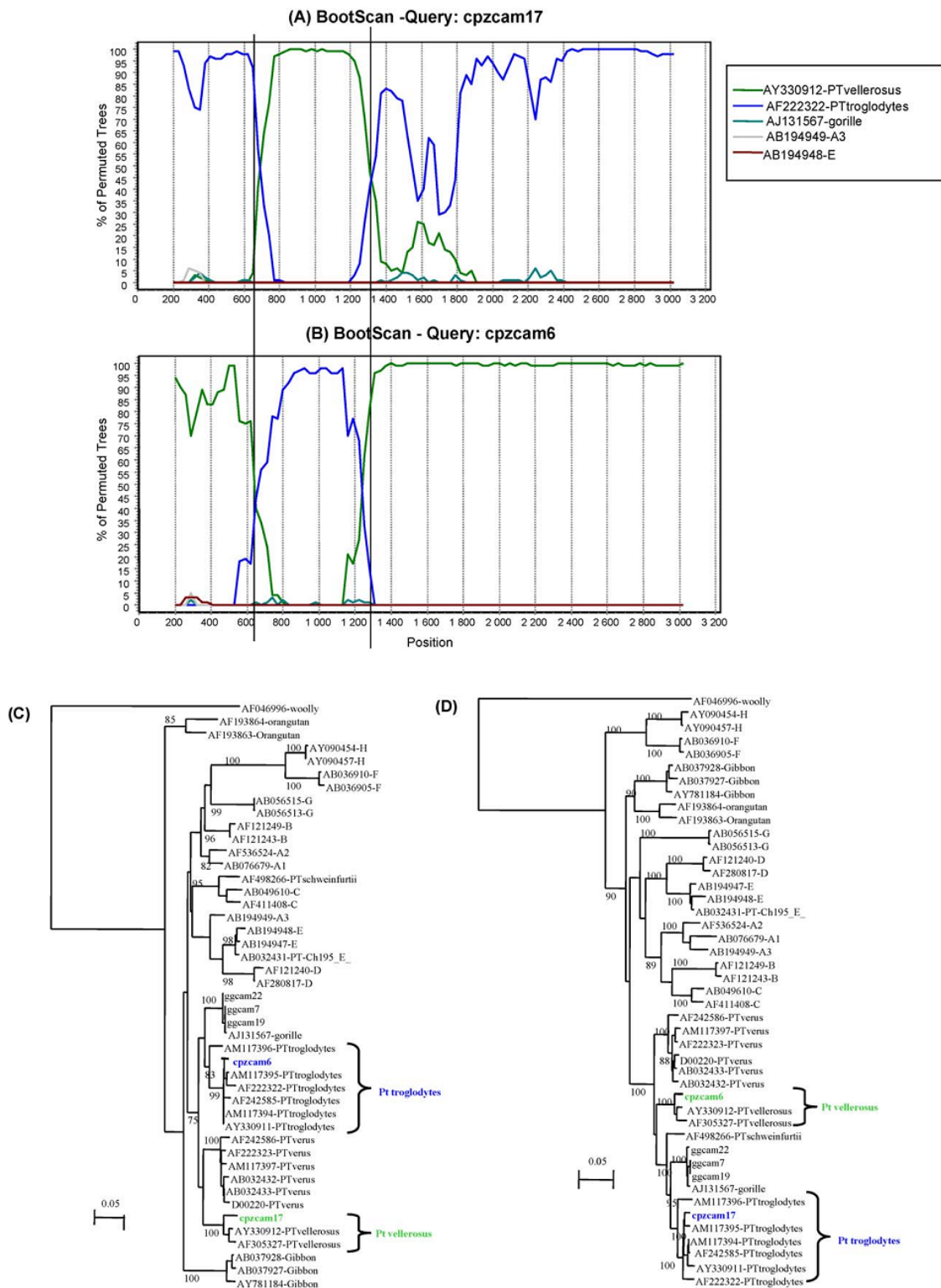


Fig. 3. SimPlot analysis demonstrating the recombination in the non-overlapping part of the polymerase coding region of the cpzcam17 (A) and cpzcam6 (B) strains. The strain was subjected to bootscan analysis over the entire genome using the SimPlot program (Lole et al., 1999) with a window size of 400 bp and a step size of 30 bp, under the F84 (ML) model, with bootstrap resampling performed 100 times. The Phylogenetic ML trees were constructed using the recombinant segments from 600 to 1200 bp (C) and from 1201 to the end (D).

(gibbons and orangutans) segregated in two different clusters. This grouping pattern is consistent with the geographic association of HBV in NHP as previously discussed (Makuwa et al., 2007; Starkman et al., 2003). HBV have been classified as genotypes and subgenotypes based on a minimum divergence of 8% and 4%, respectively between complete genome sequences (Norder et al., 2004). Within the African apes' clade, HBV sequences from the subspecies *P. t. troglodytes* grouped in separated cluster from HBV sequences from the subspecies *P. t. vellerosus* despite the fact that these two chimpanzee subspecies share the same environment in Cameroon. The gorilla HBV strains were also distinct to the HBV strains from chimpanzees living in the same geographic environment. These observations also provide an argument in favour of subspecies association of HBV. Similar observations have been previously discussed (Starkman et al., 2003). The recombination affecting a short, non-overlapping segment of the polymerase domain found in two of the Cameroonian chimpanzee strains is the first event documented to have occurred between HBV from *P. t. vellerosus* and *P. t. vellerosus*. Further studies are required to investigate the distribution of these HBV recombinants in Africa and its biological significance.

To date, only one HBV sequence was described from a wild-caught gorilla (AJ131567) originating from Cameroon. Phylogenetic analyses showed that this sequence fell in a position within the chimpanzee cluster and this was considered as an exception to the species and subspecies association of HBV from apes in Africa. The three new gorilla derived HBV sequences, we described, grouped together with this formerly unique reported HBV sequence, in a strong bootstrap supported group. The data reported here wipe out the temptation to explain away the position of the previously known unique gorilla sequence as either laboratory error or contamination. Furthermore, before the present report, the unexpected position gorilla derived HBV sequence (AJ131567) could also be explained away by inadvertent transmission of HBV from chimpanzee to that wild-caught gorilla from Cameroon during captivity. In our study, the HBV amino acid patterns specific to each apes species were consistent with phylogenetic results and this reinforced the existence of a specific HBV strain in naturally infected gorillas in the wild.

Since HBV sequences from chimpanzees and gorillas differ from each other by nucleotide sequence distances less than 8%, great apes in Africa share the same genotype ChHBV, with GoHBV being one of its sub-genotypes according to this genetic classification. Comparatively, two genotypes are found in Asian great apes where gibbons and orang-utans harbour distinct HBV genotypes (Sanguanmoo et al., 2008).

In conclusion, findings from this and previous studies show that HBV infection is endemic in wild-born chimpanzees and gorillas in Africa. This study showed the evidence of active HBV infection in wild born gorillas and demonstrated the existence of gorillas' specific HBV strains distinct but related to those found in chimpanzees living in the same habitat in Cameroon, strengthening the substantial evidence of species association of HBV in NHPs. Recombination between HBV *P. t. troglodytes* and *P. t. vellerosus* strains is described.

Acknowledgements

We acknowledge all zoos and primates keeping institutions (Cameroonian Wild Aid Fund, the Limbe Wildlife Foundation, the

Pandrillus Organization) which provided for this study non-human primate plasma and information, including species and subspecies identification. We are also grateful to JM Reynes for critical reading of the manuscript and to Regis Pouillot and Ahidjo Ayouba for assistance in Phylogenetic analyses.

The study was financially supported by the Centre Pasteur of Cameroon.

References

- Chiaromonte, M., Stroffolini, T., Ngatchu, T., Rapicetta, M., Lantum, D., Kaptue, L., Chionne, P., Conti, S., Sarrecchia, B., Naccarato, R., 1991. Hepatitis B virus infection in Cameroon: a seroepidemiological survey in city school children. *J. Med. Virol.* 33, 95–99.
- Garrigue, G., Merlin, M., Durand, J., Josse, R., Kollo, B., Trepo, C., Bemba, D., 1985. Prevalence of markers of viral hepatitis B in northern Cameroon. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 78, 883–889.
- Grethe, S., Heckel, J.-O., Rietschel, W., Hufert, F.T., 2000. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J. Virol.* 74, 5377–5381.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Lanford, R.E., Chavez, D., Brasky, K.M., Burns III, R.B., Rico-Hesse, R., 1998. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5757–5761.
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C., 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152–160.
- MacDonald, D.M., Holmes, E.C., Lewis, J.C.M., Simmonds, P., 2000. Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *J. Virol.* 74, 4253–4257.
- Makuwa, M., Souquiere, S., Bourry, O., Rouquet, P., Telfer, P., Mauciere, P., Kazanji, M., Roques, P., Simon, F., 2007. Complete-genome analysis of hepatitis B virus from wild-born chimpanzees in central Africa demonstrates a strain-specific geographical cluster. *J. Gen. Virol.* 88, 2679–2685.
- Makuwa, M., Souquiere, S., Telfer, P., Bourry, O., Rouquet, P., Kazanji, M., Roques, P., Simon, F., 2006. Hepatitis viruses in non-human primates. *J. Med. Primatol.* 35, 384–387.
- Mbanya, D., Binam, F., Kaptue, L., 2001. Transfusion outcome in a resource-limited setting of Cameroon: a five-year evaluation. *Int. J. Infect. Dis.* 5, 70–73.
- Ndumbe, P., Njie, T., 1989. Hepatitis A and B infections in Yaounde, Cameroon. *Res. Virol.* 140, 253–261.
- Nerrienet, E., Santiago, M.L., Foupouapouognigni, Y., Bailes, E., Mundy, N.I., Njinku, B., Kfutwah, A., Muller-Trutwin, M.C., Barre-Sinoussi, F., Shaw, G.M., Sharp, P.M., Hahn, B.H., Ayouba, A., 2005. Simian immunodeficiency virus infection in wild-caught chimpanzees from Cameroon. *J. Virol.* 79, 1312–1319.
- Norder, H., Couroucé, A., Coursaget, P., Echevarria, J., Lee, S., Mushahwar, I., Robertson, B., Locarnini, S., Magnius, L., 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47, 289–309.
- Robertson, B., Margolis, H., 2002. Primate hepatitis B viruses – genetic diversity, geography and evolution. *Rev. Med. Virol.* 12, 133–141.
- Robertson, D.L., Hahn, B.H., Sharp, P.M., 1995. Recombination in AIDS viruses. *J. Mol. Evol.* 40, 249–259.
- Sanguanmoo, P., Thongmee, C., Ratanakorn, P., Pattanarangsarn, R., Boonyarittichai, R., Chodapisitkul, S., Theamboonlers, A., Tangkijvanich, P., Poovorawan, Y., 2008. Prevalence, whole genome characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in captive orangutan and gibbon. *J. Med. Primatol.* 37, 277–289.
- Sall, A., Starkman, S., Reynes, J., Lay, S., Nhim, T., Hunt, M., Marx, N., Simmonds, P., 2005. Frequent infection of *Hylobates pileatus* (piledated gibbon) with species-associated variants of hepatitis B virus in Cambodia. *J. Gen. Virol.* 86, 333–337.
- Starkman, S., MacDonald, D., Lewis, J., Holmes, E., Simmonds, P., 2003. Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology* 314, 381–393.
- Takahashi, K., Brotman, B., Usuda, S., Mishiro, S., Prince, A., 2000. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 267, 58–64.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Zekeng, L., Kaptue, L., 1990. HIV-1 serology and carrier state for HBs and HBe in blood donors at Yaounde University Hospital Center, Cameroon. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 70, 49–53.

Annexe 2

SHORT PAPER

Prevalence of hepatitis B virus infection among *Cercopithecidae* monkeys in Cameroon

Hepatitis B virus (HBV) infection represents a world-wide health problem, affecting approximately one-third of the world's human population and accounting for approximately one million deaths from chronic liver disease and hepatocellular carcinoma each year. Human populations in South-East Asia, sub-Saharan Africa, Central and South America show particularly high frequencies of HBV infection. Hepatitis B virus infection has also been documented in non-human primates (NHP) including chimpanzees and gorillas in sub-Saharan Africa [6, 13], gibbons and orangutans in South-East Asia [3, 13]. A highly divergent hepadnavirus distantly related to human HBV groups was recently isolated from a woolly monkey (*Lagothrix lagothrica*), a New World primate found in Central and South America [4]. Apart from humans and NHP, a range of highly genetically divergent HBV-like viruses have been detected in New World rodents such as woodchucks (*Marmota monax*) [2], ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*) [11] and arctic ground squirrels (*S. parryi*) [14] and a range of bird species [ducks (*Anas platyrhynchos*), geese (*Branta hutchinsii*) and grey heron (*Ardea cinerea*)] [1, 7, 12]. Even if HBV-like viruses are widely distributed in numerous species ranging from great apes to rodents, an HBV counterpart has not been reported in *Cercopithecidae* monkeys since all [6, 13] but one [3] previous studies failed to detect HBV infection among them. In spite of the fact that they share the same geographical habitat, HBV variants infecting great apes and humans in Central Africa and South-East Asia are genetically distinct from each other, providing evidence for the existence of separate indigenous virus populations. Although there is currently no evidence that human populations have been or are infected with great apes-associated HBV variants, the existence of this NHP reservoir of HBV could represent a handicap for the eradication of human HBV infection. It is therefore necessary in endemic areas to document the frequency of HBV infections in human and NHP populations. In a previous study, we show a high prevalence of HBV infection in chimpanzees (6.9%) and gorillas (11.6%) populations in Cameroon [9]. No information is available on the prevalence of HBV infection in *Cercopith-*

ecidae monkey populations in Cameroon. We thus investigated the presence of HBV in plasma samples from wild-born *Cercopithecidae* monkeys originating from Cameroon.

Plasma samples from 181 *Cercopithecidae* monkeys were available for screening (Table 1). These samples were collected from 1997 to 2006 from wild-born orphaned monkeys living mainly in the Southern rain forest areas of Cameroon. These animals have been transferred to zoos or rescue centres, generally after their mothers had been killed by hunters. On arrival, they were put into quarantine and samples collected for routine veterinary screenings, including HBV detection. This screening was performed to note serological status of animals in the wild before any contact with the other animals in these centres. Healthy animals were then integrated into specific communities. The animals included in this study were cared for and used humanely. Plasmas collected on ethylene diamine tetra-acetate tubes were sent to the Centre Pasteur of Cameroon (CPC) for analyses. The subspecies origin of these animals was determined by mitochondrial DNA (mtDNA) analysis as described previously [8].

Table 1 HBsAg and hepatitis B virus (HBV) DNA in wild-caught *Cercopithecidae* monkeys from Cameroon with reference to taxonomic species

Specie names	HBsAg [n/N (%)] ¹	HBV DNA (n/N) ¹
<i>Papio anubis</i>	2/25 (8)	0/25
<i>Mandrillus sphinx</i>	0/16	0/16
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	0/34	0/34
<i>Erythrocebus patas</i>	0/10	0/10
<i>Lophocebus albigena</i>	0/1	0/1
<i>Cercocebus agilis</i>	1/13 (7.7)	0/13
<i>Cercocebus torquatus</i>	0/13	0/13
<i>Cercopithecus aethiops tantalus</i>	0/12	0/12
<i>Cercopithecus cephus</i>	1/7 (14.3)	0/7
<i>Cercopithecus erythrotis</i>	0/6	0/6
<i>Cercopithecus mona</i>	0/12	0/12
<i>Cercopithecus neglectus</i>	0/5	0/5
<i>Cercopithecus nictitans</i>	0/17	0/17
<i>Cercopithecus preussi</i>	1/10 (10)	0/10
	5/181 (2.8)	0/181

¹n, number of positive; N, number tested; %, prevalence.

The presence of HBsAg was assessed using a commercially available Enzyme Immunoassay (EIA), Monolisa Ag HBs Plus (Biorad, Marnes la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. Positive HBsAg samples were subjected to a second serological test (AxSYM HBsAg V2, Abbott, Rungis, France). A sample was considered positive if its optical density/cut-off ratio was ≥ 1.0 with both assays. We considered as weakly positive samples for which both EIAs ratio were between 1.0 and 2.0. All samples with EIAs ratio < 1.0 were considered negative. HBsAg serology was weakly positive in 5/181 (2.8%) Cercopithecidae monkeys including 2/25 *Papio anubis*, 1/13 *Cercocebus agilis*, 1/7 *Cercopithecus cephus* and 1/10 *Cercopithecus preussi* (Table 1).

The presence of HBV DNA in these samples was checked by using the following protocol. HBV DNA was first extracted from 200 μ l of clarified plasma using Qiamp[®] DNA Extraction Mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Hepatitis B virus DNA was detected by nested polymerase chain reaction (PCR) amplification of a 415-bp fragment of the S gene using two sets of degenerated primers (S1/S24 for the first round PCR and S3/S23 for the second round PCR) [13]. Furthermore, four sets of previously described degenerated nested primers [5] spanning the complete genome were also used. The amplification strategy as well as primer combinations is described elsewhere [10]. None of the 181 *Cercopithecidae* monkeys showed a positive PCR (Table 1).

In this study, a large number of sera from monkeys in Cameroon were analysed for HBsAg and HBV DNA. HBsAg positive without detectable HBV DNA was found in about 3% of *Cercopithecidae* monkeys. Except for one study [3], earlier studies [6, 13] had failed to detect HBV in *Cercopithecidae* monkeys. Several hypotheses could be proposed to explain this cross-serologic reactivity with human HBsAg ELISA test. Considering the low optical densities obtained in

ELISA tests, it could be a non-specific reactivity, because HBV DNA was not detected. It could also be a specific reaction to HBV strains refractory to amplification with the primers used in this study. *Cercopithecidae* monkeys could be infected with HBV variants so divergent in sequence from previously characterized strains infecting humans and other primates. More specific primers are required for the PCR-based screening of potentially divergent HBV-like viruses in *Cercopithecidae* monkeys. Specific tests that could recognize a wide range of potentially divergent HBV-like viruses need to be developed to investigate the distribution of HBV-like viruses in *Cercopithecidae* monkeys.

In conclusion, findings from this and previous studies show that HBV infection is an exceptional event in wild-born *Cercopithecidae* monkeys. However, the specificity of HBsAg reactivity in *Cercopithecidae* monkeys obtained in this study has to be explored deeply before ruling out a definitive conclusion about the occurrence of HBV infection in these species.

Acknowledgments

We acknowledge all zoos and primate keeping institutions which provided non-human primate sera and information for this study. The authors are grateful to Dr. Anfumbom Jude Kfutwah for language correction. The study was financially supported by the Centre Pasteur du Cameroun.

Yacouba Foupouapouognigni, Serge A.S. Mba & Richard Njouom
Service de Virologie, Centre
Pasteur du Cameroun, BP 1274 Yaounde, Cameroon
e-mail: njouom@pasteur-yaounde.org or
njouom@yahoo.com

References

- 1 Chang S, Netter H, Bruns M, Schneider R, Frolich K, Will H: A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology* 1999; **262**:39–54.
- 2 Galibert F, Chen TN, Mandart E: Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence. *J Virol* 1982; **41**:51–65.
- 3 Heckel J, Rietschel W, Hufert F: Prevalence of hepatitis B virus infections in nonhuman primates. *J Med Primatol* 2001; **30**:14–9.
- 4 Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB III, Rico-Hesse R: Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *PNAS* 1998; **95**:5757–61.
- 5 MacDonald DM, Holmes EC, Lewis JCM, Simmonds P: Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *J Virol* 2000; **74**:4253–7.
- 6 Makuwa M, Souquiere S, Telfer P, Bourry O, Rouquet P, Kazanji M, Roques P, Simon F: Hepatitis

Short Paper

- viruses in non-human primates. *J Med Primatol* 2006; **35**:384–7.
- 7 Mandart E, Kay A, Galibert F: Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J Virol* 1984; **49**:782–92.
- 8 Nerrienet E, Santiago ML, Foupouapouognigni Y, Bailes E, Mundy NI, Njinku B, Kfutwah A, Muller-Trutwin MC, Barre-Sinoussi F, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH, Ayouba A: Simian immunodeficiency virus infection in wild-caught chimpanzees from Cameroon 10.1128/JVI.79.2.1312-1319.2005. *J Virol* 2005; **79**:1312–9.
- 9 Njouom R, Mba S, Nerrienet E, Foupouapouognigni Y, Rousset D: Detection and characterization of hepatitis B virus strains from wild-caught gorillas and chimpanzees in Cameroon, Central Africa. *Infect Gen Evol* 2010; **10**:790–6.
- 10 Sall A, Starkman S, Reynes J, Lay S, Nhim T, Hunt M, Marx N, Simmonds P: Frequent infection of *Hylobates pileatus* (pileated gibbon) with species-associated variants of hepatitis B virus in Cambodia. *J Gen Virol* 2005; **86**:333–7.
- 11 Seeger C, Ganem D, Varmus HE: Nucleotide sequence of an infectious molecularly cloned genome of ground squirrel hepatitis virus. *J Virol* 1984; **51**:367–75.
- 12 Sprengel R, Kaleta EF, Will H: Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 1988; **62**:3832–9.
- 13 Starkman S, MacDonald D, Lewis J, Holmes E, Simmonds P: Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology* 2003; **314**:381–93.
- 14 Testut P, Renard C, Terradillos O, Vitvitski-Trepo L, Tekaiia F, Degott C, Blake J, Boyer B, Buendia M: A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* 1996; **70**:4210–9.

Annexe 3

Hepatitis B and C Virus Infections in the Three Pygmy Groups in Cameroon[∇]

Yacouba Foupouapouognigni,¹ Serge Alain Sadeuh Mba,¹ Edouard Betsem à Betsem,^{2,3} Dominique Rousset,¹ Alain Froment,⁴ Antoine Gessain,² and Richard Njouom^{1*}

Service de Virologie, Centre Pasteur du Cameroun, B.P. 1274 Yaoundé, Cameroon¹; Unité d'Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, URA CNRS 3015, Département de Virologie, Institut Pasteur, 25–28 rue du Dr Roux, 75724 Paris, Cedex 15, France²; Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon³; and Institut de Recherche pour le Développement, Musée de l'Homme, place du Trocadéro, 75016 Paris, France⁴

Received 21 July 2010/Returned for modification 8 October 2010/Accepted 15 November 2010

A high (11.8%) level of hepatitis B virus (HBV) infection was found among 524 Pygmies in Cameroon, whereas the extent of hepatitis C virus (HCV) infection in the same population was low (0.6%). Phylogenetic analyses showed cocirculation of two HBV genotypes, HBV-A3 and -E. Taken together, our results suggest different epidemiological scenarios concerning HBV and HCV infections in this population.

Sub-Saharan Africa is considered to be an area of high hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) endemicity (6, 11). However, to date little information has been available pertaining to the prevalence and genetic diversity of these viruses in central Africa. In Cameroon, HBV and HCV infections have been studied mostly among Bantu populations (4, 13, 15), and very few data are available for the Pygmies in this region. The Pygmies have lived in a forest environment in Cameroon for more than 20,000 years, mostly as hunter-gatherers (19). The characterization of HBV and HCV isolates from ancient populations may help to reveal the origin and evolutionary history of these viruses (7). Three distinct Pygmy groups currently live in Cameroon: the Baka, the Bakola, and the Bedzan. Three studies conducted 15 years ago reported a high HCV prevalence, ranging from 6 to 11%, in the Pygmy population (5, 10, 12). However, these studies only considered the Baka. Furthermore, the performances of the tests used at that time are questionable. A more recent study demonstrated an HCV prevalence of only 2.3% (8). In those 4 studies, Cameroon was found to be an area where HBV is highly endemic. Even now, no comparable information is available for the Bakola or Bedzan Pygmies. Thus, the objectives of our study were to assess the prevalence of HBV and HCV markers among the three Pygmy groups from Cameroon and also to study the HBV genetic diversity in these populations.

This study formed part of a survey of viral emergence in Pygmies from Cameroon conducted from 2005 to 2008 (1–3). Informed consent was obtained from adults (or from parents, in the case of children) before blood sampling. Furthermore, the participants of the study underwent a medical examination and, if necessary, were treated according to local procedures on site or were sent to local medical facilities. The geographic localization, the number of subjects included in each group, the mean age, and the sex ratio are shown in Fig. 1A.

The presence of antibodies against HCV (anti-HCV) was checked by the use of a third-generation enzyme immunoassay (EIA) (Monolisa anti-HCV Plus version 2; Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France). A positive result for anti-HCV was defined as a Monolisa ratio of greater than 6 (16). Of the 346 available samples tested, only 2 (0.6%) (one Baka and one Bedzan; 95% confidence interval [CI], 0.9 to 1.9%) were anti-HCV positive. Those samples were negative when tested for HCV RNA.

HBV surface antigen (HBsAg) was screened for by a third-generation EIA (Monolisa AgHBs Plus; Bio-Rad). Of the 524 samples tested, 62 (11.8%) (95% CI, 9.2 to 14.9%) were positive. The prevalence rates of HBsAg were not statistically different between the three ethnic groups over the same age range. However, in the Baka population, there was a significant association between a decrease in HBsAg and an increase in age, dropping from 23.5% in the ≤10-year-old group to 6.6% in the >50-year-old population ($P < 0.001$) (Table 1). Subsequent to their use in a larger epidemiological survey in the same population (1–3), not all samples were available for molecular analyses. A 423-bp fragment of the HBV S gene was amplified as described previously (18) and sequenced from 22 HBsAg-positive serum samples (from 15 Baka, 5 Bakola, and 2 Bedzan individuals). After sequence alignment, 17 (77.3%) sequences were seen to belong to the HBV-A3 subgenotype and 5 (22.7%) to the HBV-E genotype. Interestingly, the 15 sequences from Baka individuals were all of the HBV-A3 subgenotype, whereas there was cocirculation of HBV-A3 and HBV-E sequences in the Bakola and Bedzan groups, with the HBV-E genotype being predominant (80%) among members of the Bakola population (Fig. 1B). The 17 HBV-A3 subgenotype sequences clustered with previously reported HBV-A4 and -A5 subgenotypes (17), although this observation was not supported by a high bootstrap value. This group was designated the “quasi-A3 subgenotype.”

The present study confirms the very low rate of HCV infection of the Baka in Cameroon (8) and extends this conclusion to the Bakola and Bedzan populations. Such a low viral prevalence, especially among elderly pygmies (people aged above 50 years), contrasts with the high rates found

* Corresponding author. Mailing address: Service de Virologie, Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274 Yaoundé, Cameroon. Phone: (237) 22 23 10 15. Fax: (237) 22 23 15 64. E-mail: njouom@pasteur-yaounde.org.

[∇] Published ahead of print on 24 November 2010.

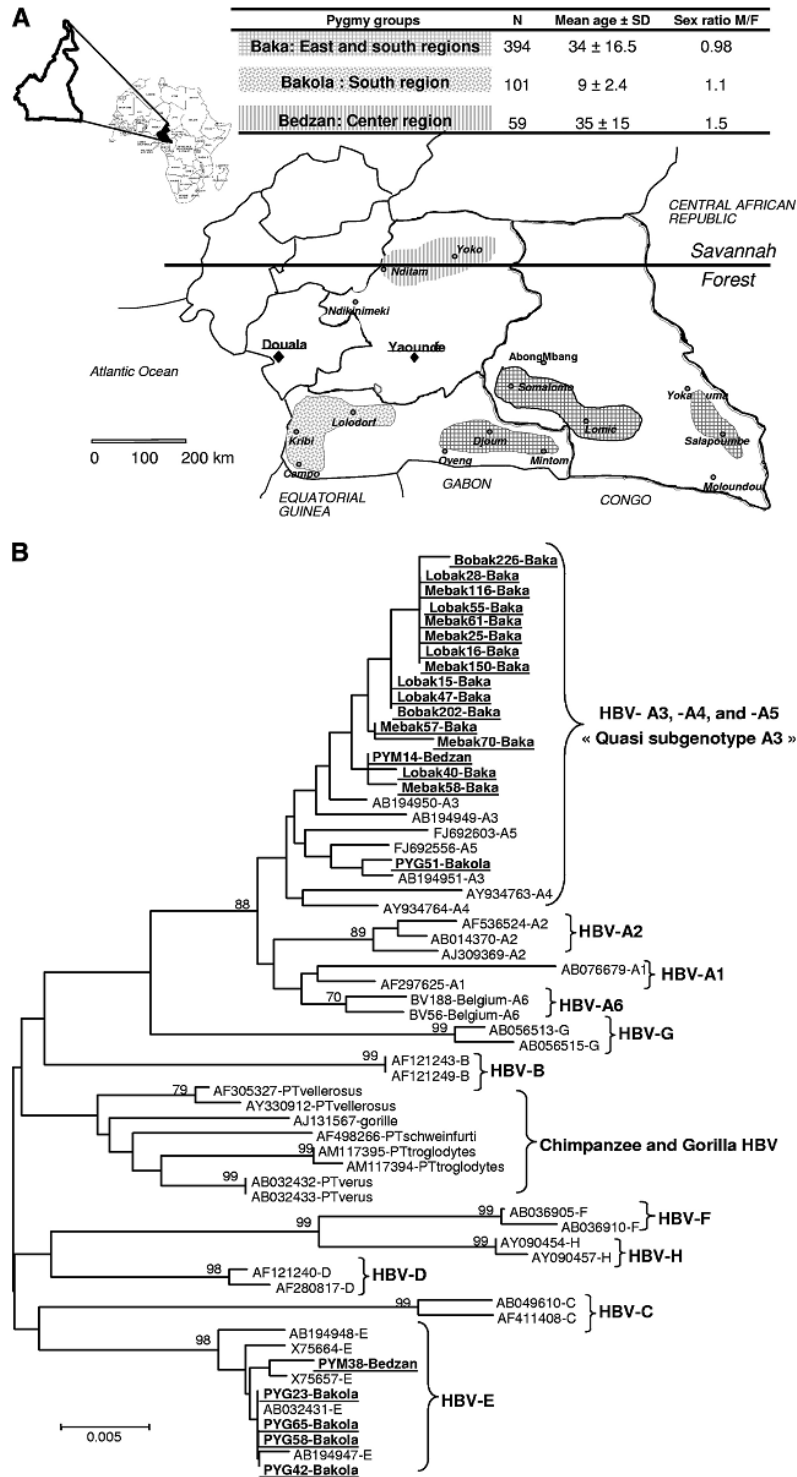


FIG. 1. (A) Map of Cameroon showing the localization of the three ethnic groups of pygmies. The number of subjects included in each group (N), the mean age, and the sex ratio are indicated in the table. The Baka group is the largest (40,000 to 45,000 individuals), and its distribution overlaps the two administrative regions of the south and the east. The Bakola pygmies are the next most populous group (4,000 to 5,000 individuals), and they are mostly located in the western part of the southern region in the Atlantic Ocean division. The Bedzan group is the smallest (700 to 1,000 individuals) and is located in the northern part of the central region. (B) Phylogenetic neighbor-joining tree constructed using the sequences of a 423-bp fragment of the HBV S gene from 22 HBV isolates (GenBank accession numbers HM355550 to HM355571) from Baka, Bakola, and Bedzan pygmies (highlighted in boldface and underlined) and 49 GenBank sequences of HBV-A to -H genotypes and chimpanzee and gorilla HBV genotypes (GenBank accession numbers and genotypes are indicated). Numbers next to the nodes of the tree represent bootstrap values (100 replicates). Only bootstrap values above 70 are presented.

TABLE 1. Prevalence of HBsAg in Pygmy populations in Cameroon, divided according to ethnic group and age range

Age range (yr)	No. of positive samples for indicated population/no. tested (%; 95% CI)			
	Baka	Bakola	Bedzan	Total
≤10	4/17 (23.5; 6.8–49.9)	13/66 (19.7; 10.9–31.2)	0	17/83 (20.5; 12.4–30.8)
11–20	9/69 (13.0; 6.1–23.3)	6/35 (17.1; 6.6–33.6)	1/9 (11.1; 0.2–48.2)	16/113 (14.2; 8.3–22.0)
21–30	10/89 (11.2; 5.5–19.7)	0	2/20 (10.0; 1.2–31.7)	12/109 (11.0; 5.8–18.4)
31–40	6/80 (7.5; 2.8–15.6)	0	3/13 (23.1; 5.0–53.8)	9/93 (9.7; 4.5–17.6)
41–50	4/49 (8.2; 2.3–19.6)	0	0/8	4/57 (7.0; 1.9–17.0)
>50	4/60 (6.6; 1.8–16.2)	0	0/9	4/69 (5.8; 1.6–14.2)
Total	37/364 (10.2; 7.3–13.7)	19/101 (18.8; 11.7–27.8)	6/59 (10.2; 3.8–20.8)	62/524 (11.8; 9.2–14.9)

among the neighboring Bantu populations (5, 8, 10, 13, 15) and points to a different route or different dynamics of HCV transmission in Cameroon. One hypothesis is that transmission among the Bantu in the past had occurred during mass treatment and vaccination with unsafe material (14).

The prevalence of HBsAg noted in our study was comparable to that reported previously in studies of the Baka (8, 12), was similar to that reported for Bantu populations (4, 8), and indicated that Cameroon is an area where HBV is highly endemic. The age-dependent HBsAg prevalence profile showing that the population of children under 10 years of age experienced a high rate of infection strongly suggested perinatal transmission or transmission in early childhood. Systematic HBV screening during pregnancy is not yet practiced in Cameroon. Furthermore, the expanded child vaccination program introduced into Cameroon in 2005 is limited to urban areas. To prevent the spread of HBV, these programs must be extended to all remote parts of the country.

From a molecular point of view, our data confirm the cocirculation of HBV-A3 and HBV-E genotypes in Pygmies living in Cameroon (8). Interestingly, Baka Pygmies were infected only by the HBV-A3 subgenotype, whereas the HBV-E genotype was predominant in the Bakola population. Despite the relatively small sample size, the different HBV genotypes present in Baka versus Bakola Pygmies raise questions regarding the origin of these viruses. The high prevalence of the HBV-A3 subgenotype, and its presence in the three groups of Pygmy, suggests a protracted natural history of this subgenotype in Cameroon, whereas the low prevalence of the HBV-E genotype may indicate recent introduction into this area. These results are in agreement with previous studies that reported a central African origin for the HBV A3 subgenotype and a west African origin for HBV-E (9). It is also notable that even though Pygmies still frequently hunt, none of the recent HBV isolates are related to HBV genotypes from chimpanzee or gorilla, suggesting the absence of cross-species transmission of this virus. This situation contrasts with that observed for foamy retroviruses in the same populations (2).

In conclusion, our data demonstrate a low prevalence of HCV infection among Pygmies living in Cameroon, reinforcing the hypothesis of a massive iatrogenic transmission of HCV in neighboring Bantu populations. Furthermore, our results extend to HBV infection the previous findings demonstrating that Cameroon is an area of high HCV en-

demicity for the 3 Pygmy groups. HBV-A3 appears to be a longstanding, indigenous HBV strain in Cameroon. Further studies designed to extensively characterize HBV strains from other indigenous populations in central Africa should reveal new insights into the origin and the evolutionary history of this oncovirus.

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank accession numbers of the HBV-A3 subgenotype and HBV-E genotype sequences described in this study are HM355550 to HM355571.

We are grateful to the members of the three Pygmy ethnic groups who agreed to participate in this study. We are also grateful to Jean-Marc Reynes and Anfumbom Jude Kfutwah for critical reading of the manuscript. The authors also thank Katherine Kean from the Pasteur Institute in Paris for language correction.

This work was funded by the Centre Pasteur of Cameroon and the Unité d'Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes of Institut Pasteur, Paris, France.

REFERENCES

1. Calattini, S., et al. 2009. New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. *J. Infect. Dis.* **199**:561–564.
2. Calattini, S., et al. 2007. Simian foamy virus transmission from apes to humans, rural Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:1314–1320.
3. Calattini, S., et al. 2005. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* **2**:30.
4. Chiaramonte, M., et al. 1991. Hepatitis B virus infection in Cameroon: a seroepidemiological survey in city school children. *J. Med. Virol.* **33**:95–99.
5. Kowo, M. P., et al. 1995. Prevalence of hepatitis C virus and other blood-borne viruses in Pygmies and neighbouring Bantus in southern Cameroon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**:484–486.
6. Kramvis, A., and M. Kew. 2007. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatol. Res.* **37**:S9–S19.
7. Kramvis, A., M. Kew, and G. François. 2005. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* **23**:2409–2423.
8. Kurbanov, F., et al. 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.
9. Kurbanov, F., Y. Tanaka, and M. Mizokami. 2010. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol. Res.* **40**:14–30.
10. Louis, F. J., B. Maubert, J. Y. Le Hesran, J. Kemmogne, E. Delaporte, and J. P. Louis. 1994. High prevalence of anti-hepatitis C virus antibodies in a Cameroon rural forest area. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**:53–54.
11. Madhava, V., C. Burgess, and E. Drucker. 2002. Epidemiology of chronic hepatitis C virus infection in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect. Dis.* **2**:293–302.
12. Ndumbe, P. M., G. Atchou, M. Biwole, V. Lobe, and J. Ayuk-Takem. 1993. Infections among pygmies in the Eastern Province of Cameroon. *Med. Microbiol. Immunol.* **182**:281–284.
13. Nerrienet, E., et al. 2005. Hepatitis C virus infection in Cameroon: a cohort-effect. *J. Med. Virol.* **76**:208–214.
14. Njoum, R., et al. 2007. The hepatitis C virus epidemic in Cameroon: genetic evidence for rapid transmission between 1920 and 1960. *Infect. Genet. Evol.* **7**:361–367.

15. **Njouom, R., et al.** 2003. High rate of hepatitis C virus infection and predominance of genotype 4 among elderly inhabitants of a remote village of the rain forest of South Cameroon. *J. Med. Virol.* **71**:219–225.
16. **Njouom, R., et al.** 2003. Hepatitis C virus infection among pregnant women in Yaounde, Cameroon: prevalence, viremia, and genotypes. *J. Med. Virol.* **69**:384–390.
17. **Pourkarim, M. R., S. Amini-Bavil-Olyae, P. Lemey, P. Maes, and M. Van Ranst.** 2010. Are hepatitis B virus “subgenotypes” defined accurately? *J. Clin. Virol.* **47**:356–360.
18. **Starkman, S. E., D. M. MacDonald, J. C. Lewis, E. C. Holmes, and P. Simmonds.** 2003. Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology* **314**:381–393.
19. **Verdu, P., et al.** 2009. Origins and genetic diversity of pygmy hunter-gatherers from Western Central Africa. *Curr. Biol.* **19**:312–318.

Annexe 4

High Prevalence and Predominance of Hepatitis Delta Virus Genotype 1 Infection in Cameroon[▽]

Yacouba Foupouapouognigni,¹ Dominique Noah Noah,² Michèle Tagni Sartre,³ and Richard Njouom^{1*}

Service de Virologie, Centre Pasteur du Cameroun, P.O. Box 1274, Yaounde, Cameroon¹; Hôpital Central de Yaoundé, Yaounde, Cameroon²; and Cabinet Médical de la Cathédrale, Yaounde, Cameroon³

Received 8 September 2010/Returned for modification 9 November 2010/Accepted 29 December 2010

Antibodies to the hepatitis delta virus (HDV) were found in 17.6% of 233 hepatitis B virus surface antigen-positive subjects in Cameroon. Phylogenetic analyses showed the presence of HDV-1, HDV-5, HDV-6, and HDV-7 genotypes. These results enrich the limited data on HDV prevalence and molecular diversity in Cameroon.

Hepatitis delta virus (HDV) is associated with hepatitis B virus (HBV) infection and is frequently related to more severe disease than that due to the underlying HBV monoinfection (5, 10). HDV infection has a worldwide distribution, but its frequency varies greatly throughout different geographic regions. It is highly endemic in the Middle East, in the Mediterranean area, in the Amazonian region, and in several African countries (3). Genomic analysis of HDV isolates from different regions of the world reported at least eight phylogenetically distinct genotypes with dissimilar geographic distributions. Apart from HDV genotype 1 (HDV-1), which is ubiquitous, each virus clade is geographically localized: HDV-2 is found in Japan, Taiwan, and Russia; HDV-4 is found in Taiwan and Japan; HDV-3 is found in the Amazonian region; and HDV-5, HDV-6, HDV-7, and HDV-8 are found in Africa (6). The role of these HDV genotypes is not yet well determined, but some studies have suggested an association between the severity of disease and infection with different HDV genotypes (4, 8). The two studies conducted 2 decades ago on HDV infection in Cameroon have reported the prevalence of antibodies against HDV (HDV-Ab) of 6.5% and 27.3%, respectively (9, 12). In spite of this high prevalence, no data on HDV genotype diversity in Cameroon are available. Therefore, in the present study, we investigated the current HDV seroprevalence and the genotype diversity in Cameroonian patients with chronic HBV infection.

This study was performed on plasma samples from 233 hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) carriers (mean age, 34.5 years; 79 women and 154 men) seen at two medical care centers in Yaounde, Cameroon, from May 2008 to May 2009. As recommended by the Cameroonian Society of Gastroenterology, in addition to the HBV DNA quantification and the assessment of biochemical liver enzyme, HDV screening should be part of the screening of HBsAg carriers, considering the endemicity of this infection in Central Africa. The analyses included in HDV screening are HDV antibody (HDV-Ab) and

HDV RNA quantification for HDV-Ab-positive patients. During the medical consultation, HBsAg carriers were screened for HDV infection and were asked to participate in this study. For carriers who agreed to participate, written informed consent was obtained for HDV genotyping, since this analysis is not part of the original protocol in a routine workup of liver disease.

The presence of HDV-Ab was determined by the Murex anti-delta assay (Abbott, Wiesbaden, Germany), and HBV DNA viral load was determined by the Abbott RealTime HBV quantification kit (Abbott Molecular Inc., Rungis, France) according to the manufacturer's protocol. During routine workup of the liver disease, the biochemical liver enzyme alanine aminotransferase (ALT) (upper normal limit, 45 IU/liter) was also assessed by standard laboratory tests. In order to detect HDV, RNA was extracted from 140 μ l HDV-Ab-positive plasma using the QIAamp RNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and HDV RNA was detected by reverse transcription (RT)-PCR amplification of a 360-bp fragment coding for the small hepatitis delta antigen (*HDV-sHD*) gene as described previously (4). HDV-Ab was found in 41 (17.6%; 95% confidence interval [CI], 13.1 to 23.2%) of the 233 tested plasma specimens, and then HDV RNA was detected in 25 (61%; 95% CI: 44.5 to 75.4%) of the 41 HDV-Ab-positive plasma specimens. The percentage of patients with abnormal serum ALT levels was significantly higher in HBsAg carriers

TABLE 1. Demographic and laboratory characteristics of the 233 HBV carriers according to HDV antibody (HDV-Ab) status

Parameter	Specimen		<i>P</i> ^a
	HDV-Ab positive (<i>n</i> = 41)	HDV-Ab negative (<i>n</i> = 192)	
Age (mean, yr)	35.7	35.4	>0.05
Gender (% male)	65.9	66.1	>0.05
Serum ALT level (median, IU/liter)	96.75	58.5	0.0004
HBV DNA level (% undetectable)	61	35.4	0.002

^a Statistical differences were evaluated using the chi-square test or Fisher's exact test to compare qualitative data. The Mann-Whitney U test was used to compare quantitative variables. Differences were considered statistically significant for *P* values less than 0.05.

* Corresponding author. Mailing address: Service de virologie, Centre Pasteur du Cameroun, P.O. Box 1274, Yaounde, Cameroon. Phone: (237) 22 23 10 15 / (237) 79 87 36 04. Fax: (237) 22 23 15 64. E-mail: njouom@pasteur-yaounde.org or njouom@yahoo.com.

[▽] Published ahead of print on 5 January 2011.

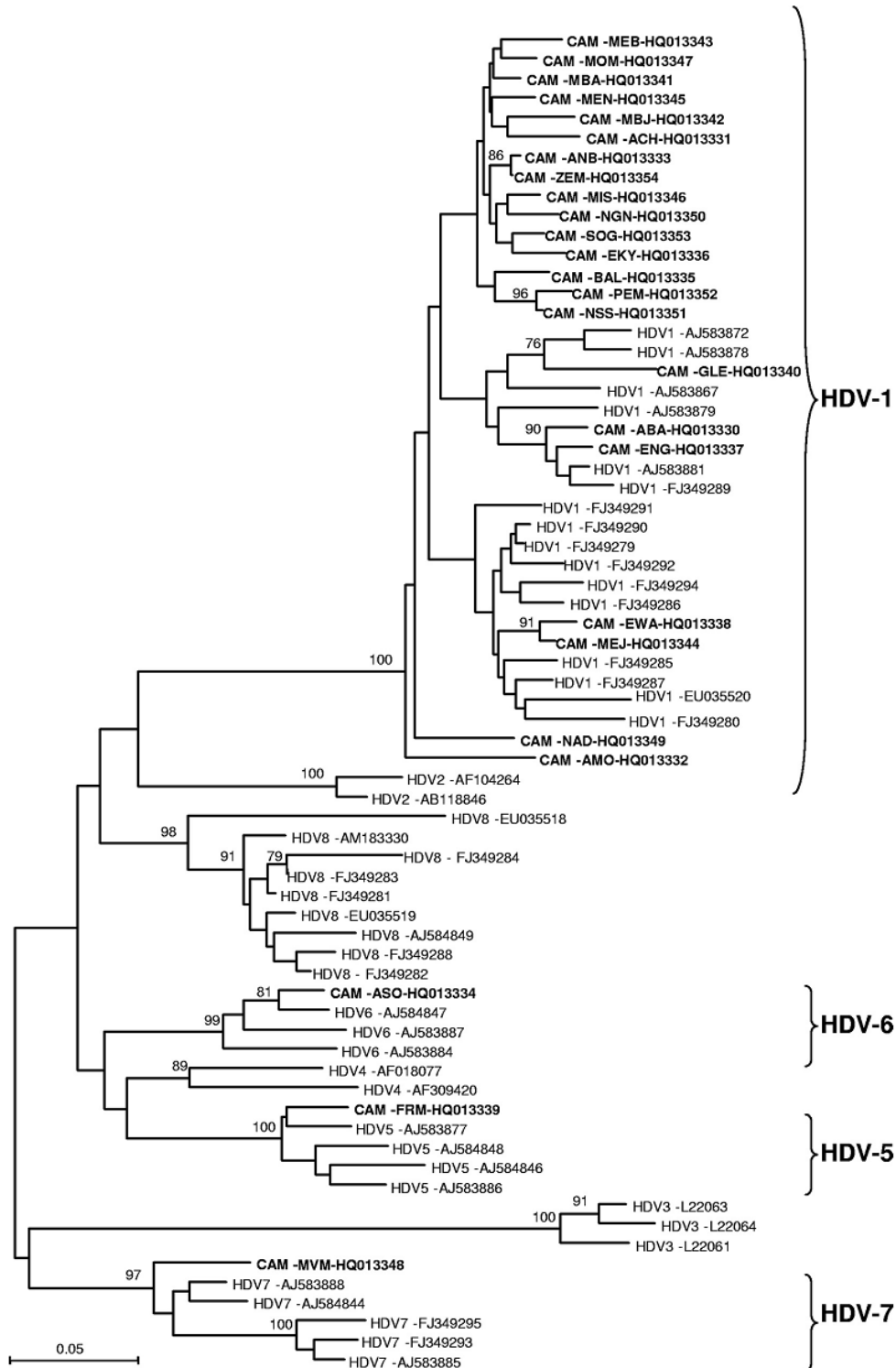


FIG. 1. Phylogenetic analysis of a 360-bp fragment of the *HDV-sHD* gene from different HDV strains using the neighbor-joining (NJ) method. Twenty-five HDV sequences from Cameroonian patients (highlighted in boldface; name of the isolate and GenBank accession number are indicated) were aligned with 41 previously published HDV sequences of clades 1 to 8 (HDV-1 to HDV-8) available from GenBank as reference genes (Genotype and GenBank accession number are indicated) by using the CLUSTAL X v1.81 software program and imported into MEGA v.4.0 software for phylogenetic analysis. Numbers next to the nodes of the tree represent bootstrap values (1,000 replicates). Only bootstrap values above 70% are presented. Genetic distances were calculated using the Kimura two-parameter method.

with HDV-Ab than in those without HDV-Ab. Remarkably; the proportion of HBsAg carriers with undetectable HBV DNA was higher in HDV-Ab-positive than in HDV-Ab-negative patients (Table 1). The phylogenetic analyses, performed as described elsewhere (11), revealed that 22 (88%) of the 25 HDV Cameroonian strains were classified as genotype 1 (HDV-1), with a 100% bootstrap value. The other three strains clustered with the previously described HDV-5, HDV-6, and HDV-7 genotypes, with bootstrap values of 100%, 99%, and 97%, respectively (Fig. 1). Although they were not supported by significant bootstrap values (less than 70%), the phylogenetic analyses indicated splitting of the Cameroonian HDV-1 genotypes into five probable "subgenotypes" (Fig. 1). The average of nucleotide differences between the 25 Cameroonian HDV genotypes was 15.5%, whereas the average of nucleotide differences within the 22 Cameroonian HDV-1 strains was 12.9% (data not shown). The average of nucleotide differences among the Cameroonian HDV-1 strains seems to be higher than the 11% average reported among other worldwide HDV-1 strains (6). This result highlights the extent of intragenotypic variation for the Cameroonian HDV-1 isolates.

The prevalence of HDV-Ab obtained in this study is as high as that previously reported by other groups from Cameroon (9, 12). HDV RNA was found in 61% of the HDV-Ab patients, indicating the low prevalence of HDV clearance in this population. The natural history of HDV infection shows that coinfection evolves to chronicity in only a small number of patients and patients recover from both hepatitis B and hepatitis D, while superinfection of HDV leads to progressive disease and cirrhosis in approximately 60 to 80% of cases (1, 2). It can thus be suggested that most of our patients acquired the infection as a superinfection on hepatitis B. It is known that coinfection or superinfection of HBV and HDV may cause severe liver diseases (1). Our observations showed that the median serum ALT level was significantly higher in carriers with HDV-Ab than in those without HDV-Ab (Table 1). In our study, the proportion of HBsAg-positive patients with undetectable HBV DNA was higher in patients with HDV-Ab than in those without HDV-Ab (61% versus 35.4%; $P < 0.05$). This result indicates, as reported by previous studies (2), the suppression/inhibition of HBV replication by HDV infection and highlights the importance of screening for HDV infection in HBV carriers. We showed the presence of four different genotypes: HDV-1, HDV-5, HDV-6, and HDV-7. HDV-1 was found to be the predominant genotype. Three new strains from Cameroon were closely related to HDV-5, HDV-6, and HDV-7 genotypes previously described from African patients (6), indicating that these genotypes are in circulation in Africa. However, although recently reported to originate and to be endemic in Central

Africa (7), the newly described HDV-8 was not found in our study. As claimed by other authors (6), the great genetic diversity of HDV found in Cameroon, with at least four different genotypes, suggests a wide and ancient spread of African HDVs. In contrast to previous studies (13), our results showed no significantly well-defined subgenotypes within genotype 1. Further studies, with full genome characterization of these strains, are required.

In conclusion, our results point to a high endemicity of HDV in Cameroonian populations, which is in sharp accordance with data reported from Cameroon 20 years ago and with the situation in neighboring Central African countries. Therefore, practitioners and health care managers should be made aware of the risk of dual infection with HBV and HDV, especially when the HBV viral load is low or undetectable with abnormal serum ALT levels. HDV infection in Cameroon is characterized by a wide genetic diversity, with the circulation of four different genotypes (1, 5, 6, and 7), HDV-1 being predominant.

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank accession numbers of the new HDV strains isolated from the population in this study are HQ013330 to HQ013354.

We are grateful to the HBsAg carriers who agreed to participate in this study. We are also grateful to Jean-Marc Reynes for critical reading of the manuscript.

This work was supported by funds from the Centre Pasteur of Cameroon.

REFERENCES

1. Govindarajan, S., K. De Cock, and A. Redeker. 1986. Natural course of delta superinfection in chronic hepatitis B virus-infected patients: histopathologic study with multiple liver biopsies. *Hepatology* 6:640-644.
2. Heidrich, B., et al. 2009. Virological and clinical characteristics of delta hepatitis in Central Europe. *J. Viral Hepat.* 16:883-894.
3. Husa, P., A. Linhartová, V. Nemeček, and L. Husová. 2005. Hepatitis D. *Acta Virol.* 49:219-225.
4. Ivaniushina, V., et al. 2001. Hepatitis delta virus genotypes I and II circulate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J. Gen. Virol.* 82:2709-2718.
5. Karayiannis, P. 1998. Hepatitis D virus. *Rev. Med. Virol.* 8:13-24.
6. Le Gal, F., et al. 2006. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1447-1450.
7. Makuwa, M., et al. 2008. Prevalence and genetic diversity of hepatitis B and delta viruses in pregnant women in Gabon: molecular evidence that hepatitis delta virus clade 8 originates from and is endemic in central Africa. *J. Clin. Microbiol.* 46:754-756.
8. Nakano, T., et al. 2001. Characterization of hepatitis D virus genotype III among Yucpa Indians in Venezuela. *J. Gen. Virol.* 82:2183-2189.
9. Ndumbe, P. 1991. Hepatitis D in Yaounde, Cameroon. *APMIS* 99:196-198.
10. Niro, G., et al. 1997. The predominance of hepatitis delta virus genotype I among chronically infected Italian patients. *Hepatology* 25:728-734.
11. Njouom, R., et al. 2009. Predominance of hepatitis C virus genotype 4 infection and rapid transmission between 1935 and 1965 in the Central African Republic. *J. Gen. Virol.* 90:2452-2456.
12. Poveda, J., et al. 1986. Carriage of HBs antigen and infection by delta agent in Cameroon. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 79:785-787. [In French.]
13. Zhang, Y., E. Tsega, and B. Hansson. 1996. Phylogenetic analysis of hepatitis D viruses indicating a new genotype I subgroup among African isolates. *J. Clin. Microbiol.* 34:3023-3030.

Annexe 5



COMITÉ NATIONAL D'ETHIQUE NATIONAL ETHICS COMMITTEE



- N° d'enregistrement : IORG0006538-IRB00007847-FWA00016054 BP 1937, Yaoundé, Tel: (237) 22 21 12 84
- Arrêté N° 079/A/MSP/DS du 22 octobre 1987 portant création et organisation d'un Comité d'Ethique de la Recherche (CER) impliquant les êtres humains
cnecprot@yahoo.fr

Yaoundé, le 11 avril 2011

AUTORISATION N° 082/CNE/SE/2011

CLAIRANCE ETHIQUE A L'AMENDEMENT

Le Comité National d'Ethique a examiné ce 08 avril 2011, la demande de la clairance éthique à l'amendement au projet de recherche intitulé: "**LE CONTROLE DES MALADIES TROPICALES A L'EPOQUE COLONIALE ET LA TRANSMISSION DU VIRUS DE L'HEPATITE C**" soumis par le **Dr NJOUOM Richard**, Investigateur Principal au Cameroun.

Le projet est digne d'intérêt et a déjà reçu l'approbation du Comité National d'Ethique en date du 21 mai 2008 (AUTORISATION N°050/CNE/DNM/08). Le comité a lu et examiné avec beaucoup d'intérêt l'article en annexe (Pépin et al., 2010) issu des premiers résultats de l'étude, et autorise que la recherche des virus à transmission parentérale soit faite sur les plasmas restants.

L'investigateur principal est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devra y apporter aucun amendement aussi mineur qu'il soit sans avis favorable du Comité National d'Ethique. Il est appelé à collaborer pour toutes descentes du Comité National d'Ethique pour suivi de la mise en œuvre dudit protocole. Les rapports annuels et le rapport final du projet devront être soumis au comité d'éthique et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La clairance éthique est délivrée pour une période d'un an et peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations sus-évoquées.

En foi de quoi la présente Clairance Ethique à l'amendement est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.



LE PRESIDENT

Pr Lazare KAPTUE

ANNEXE 6

Les caractéristiques démographiques, les charges virales VHB, les marqueurs sérologiques et le résultat de l'anticorps delta chez les porteurs chroniques du VHB à Yaoundé

Code	SEXE	AGE	CV HBV (UI/ml)	Log CV VHB	AgHBc	AcHBc	AcHBc	D.O	Ac Delta
ABA	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,052	Pos
ABB	M	42	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,174	Nég
ABD	M		5291	3,72	Neg	Pos	Pos	1,217	Nég
ABJ	M	33	12	1,08			Pos	1,175	Nég
ACC	F	59	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,052	Pos
AKU	F	38	12	1,08			Pos	0,895	Nég
ALL		21	47	1,67	Neg	Pos	Pos	1,684	Nég
AMA	F	22	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,815	Nég
AMM	M	45	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,073	Pos
AMN	F	13	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,401	Nég
AMU	F	43	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,046	Pos
ANL	M	38	282	2,45	Neg	Pos	Pos	0,055	Pos
ANY	F	37	39566	4,60	Neg	Pos	Pos	1,507	Nég
ASO	M	33	617	2,79			Pos	1,573	Nég
ASS	M	38	990907	6,00	Neg	Pos	Pos	0,051	Pos
ATB	M	34	113	2,05			Pos	1,33	Nég
ATP	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,05	Nég
AWA		27	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,084	Nég
BAD	M		1112	3,05	Neg	Neg	Pos	1,459	Nég
BAL	F		12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,044	Pos
BAM	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,16	Nég
BAN			32783800	7,52	Neg	Pos	Pos	1,438	Nég
BEG	M	49	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,005	Nég
BIK	F	50	195	2,29	Neg	Pos	Pos	1,463	Nég
BIY	F	19	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,054	Pos
BMA	M	50	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,053	Pos
BOB	M	38	364	2,56	Neg	Pos	Pos	1,548	Nég
BOF	F		12	1,08			Pos	1,09	Nég
BON	M	27	17473	4,24	Neg	Pos	Pos	1,419	Nég
CAT	M	19	2096	3,32			Pos	0,054	Pos
CHA	M	28	12	1,08			Pos	1,394	Nég
CHE	M	37	1540	3,19	Neg	Pos	Pos	1,409	Nég
DEM	M	53	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,346	Nég
DIA	F	50	1270	3,10	Neg	Pos	Pos	1,481	Nég
DIB	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,256	Nég
DJD	F	33	54	1,73	Neg	Pos		1,155	Nég
DJI	M	33	179019	5,25	Neg	Neg	Pos	1,54	Nég
DJM	M	45	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,142	Nég
DJN	F	23	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,055	Nég
EBE	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,043	Nég
EBF	M	53	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,055	Pos
EDI	M	40	2122	3,33	Neg	Pos	Pos	1,318	Nég

Prévalence et diversité génétique des virus des hépatites B (VHB) et D (VHD) chez les populations humaines, et les primates non humains du Cameroun : transmission inter-espèce

EFF	M	26	146827	5,17	Neg	Pos	Pos	1,205	Nég
EKA	F	47	17727	4,25	Neg	Pos	Pos	0,085	Pos
EKF	F	48	12	1,08			Pos	1,197	
EKS	F	39	42	1,62			Pos	0,055	Pos
EKT		37	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,203	Nég
ELE	M	47	24696	4,39	Neg	Pos	Pos	1,461	Nég
ELH	M	31	226	2,35	Neg	Pos	Pos	1,489	Nég
ELR	F	66	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,11	Nég
EME	F	41	363	2,56	Neg	Pos	Pos	1,423	Nég
EMG	F	27	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,064	Nég
ENA	M	37	1612	3,21	Neg	Pos	Pos	0,162	Pos
ESR	F	45	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,964	Nég
ETO	M	29	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,952	Nég
EWA	M	23	49745	4,70			Pos	0,065	Pos
EYA	M	22	67	1,83			Pos	1,475	Nég
FAD	M		12	1,08			Pos	1,063	Nég
FAN	M	14	741	2,87	Neg	Pos	Pos	1,73	Nég
FER	M	30	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,121	Nég
FOE	M	30	641	2,81	Neg	Pos	Pos	1,542	Nég
FOG	F	54	106	2,03	Neg	Pos	Pos	1,406	Nég
FOS	M	35	1011	3,00			Pos	1,487	Nég
FOU	M	36	1914	3,28	Neg	Pos	Pos	1,394	Nég
GLE	M	39	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,049	Pos
GUT	M	37	770	2,89	Neg	Neg	Pos	1,492	Nég
HAB	F	70	321	2,51	Neg	Pos	Pos	1,594	Nég
HAH	M	49	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,23	Nég
HAM	M		36096	4,56	Neg	Pos	Pos	1,457	Nég
HAO	F	33	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,053	Pos
IPI	F	22	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,045	Pos
ISS	M	41	863	2,94			Pos	0,059	Pos
KAB	M		388821	5,59	Neg	Pos	Pos	1,586	Nég
KAC	M	18	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,349	Nég
KAM	M	32	56808	4,75	Neg	Pos	Pos	1,487	Nég
KAN	M	36	372	2,57	Neg	Pos	Pos	1,463	Nég
KAO	M	37	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,057	Nég
KAY	F	35	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,872	Nég
KEM	F	29	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,296	Nég
KEN	M	25	1043	3,02	Neg	Neg	Pos	1,402	Nég
KES	F	25	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,022	Nég
KEU	F	30	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,23	Nég
KOA			12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,166	Nég
KOJ	F	43	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,54	Pos
KOK	M	37	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,245	Nég
KOM	F	45	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,007	Nég
KOO	M	21	1083	3,03			Pos	1,559	Nég
KWE	M	26	7112	3,85			Pos	1,508	Nég
LAD	M	30	11000000	8,04	Neg	Neg	Pos	1,612	Nég

Prévalence et diversité génétique des virus des hépatites B (VHB) et D (VHD) chez les populations humaines, et les primates non humains du Cameroun : transmission inter-espèce

LEL	M	48	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,544	Nég
LEU	F	40	6166	3,79	Neg	Pos	Pos	1,447	Nég
MAD	M	43	23043	4,36	Neg	Pos	Pos	1,337	Nég
MAF	F		97176	4,99	Neg	Pos	Pos	1,637	Nég
MAG	M	41	2467	3,39	Neg	Pos	Pos	1,471	Nég
MAL	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,237	Nég
MAT	M	18	812	2,91	Neg	Pos	Pos	1,57	Nég
MBE		40	1219	3,09	Neg	Pos	Pos	1,512	Nég
MBI	M	43	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,048	Pos
MBJ	F	30	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,52	Nég
MBM	F	26	995	3,00	Neg	Pos	Pos	1,604	Nég
MBO	M	53	6944	3,84	Neg	Pos	Pos	1,413	Nég
MBT					Neg	Pos	Pos		Nég
MEA	M	47	866	2,94			Pos	1,449	Nég
MEE	M	41	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,992	Nég
MEG	M	44	26	1,41			Pos	1,472	Nég
MEI	M	35	285	2,45	Neg	Pos	Pos	1,445	Nég
MEJ	M	29	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,048	Pos
MEK	M	20	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,068	Nég
MEN	F	41	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,816	Nég
MEO	F	37	16	1,20			Pos	1,395	Nég
MEP	M	43	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,052	Pos
MER	M	34	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,211	Nég
MES	F	38	4540	3,66	Neg	Pos	Pos	1,569	Nég
MET	F	29	5963	3,78	Neg	Pos	Pos	1,327	Nég
MID	F	17	2972	3,47	Neg	Neg	Pos	0,053	Pos
MIS	M	34	73962	4,87	Neg	Pos	Pos	0,22	Pos
MNN		38	6710	3,83	Neg	Neg	Pos	0,039	Pos
MNT	M	41	8192	3,91	Neg	Pos	Pos	1,625	Nég
MOT	M	56	209	2,32	Neg	Pos	Pos	0,054	Pos
MVO		25	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,061	Pos
NAA	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,233	Nég
NAB	M		418	2,62	Neg	Pos	Pos	1,511	Nég
NAI	M	4	12	1,08			Neg	1,049	Nég
NAJ	M	44	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,211	Pos
NAK	F	39	1977	3,30	Neg	Pos	Pos	1,555	Nég
NAN	F	46	690	2,84	Neg	Pos	Pos	1,586	Nég
NAO	M	38	6659	3,82	Neg	Pos	Pos	1,234	Nég
NDB	M	49	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,038	Pos
NDG	M	50	26	1,41	Neg	Pos	Pos	0,069	Pos
NDM	F	27	5176	3,71			Pos	1,427	Nég
NDO	M	42	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,183	Nég
NZO	M	29	1574	3,20	Neg	Pos	Pos	1,552	Nég
NGA	M	46	20978450	7,32			Pos	1,944	Nég
NGB	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,354	Nég
NGE	M	62	248	2,39	Neg	Pos	Pos	1,554	Nég
NGF	F	31	3631	3,56	Neg	Pos	Pos	1,412	Nég
NGG	M	30	263	2,42			Pos	1,372	Nég
NGC	M	45	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,057	Pos
NGJ	F	36	763	2,88			Pos	1,267	Nég

Prévalence et diversité génétique des virus des hépatites B (VHB) et D (VHD) chez les populations humaines, et les primates non humains du Cameroun : transmission inter-espèce

NGK	M	39	6965	3,84	Neg	Pos	Pos	1,541	Nég
NGL	F	35	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,191	Nég
NGM 1	F	39	747	2,87	Neg	Pos	Pos	1,553	Nég
NGM 2			8210	3,91	Neg	Pos	Pos	1,361	Nég
NGO	M	19	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,049	Pos
NGD	M	50	308	2,49			Pos	1,463	Nég
NGP	M	53	12	1,08			Pos	1,03	Nég
NGQ	M	42	4926	3,69	Neg	Pos	Pos	1,53	Nég
NGS	M	26	784	2,89			Pos	1,474	Nég
NGT	M	28	4096	3,61	Neg	Pos	Pos	1,314	Nég
NGW	M	54	12	1,08			Neg	0,726	Nég
NJB	M	45	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,989	Nég
NJC	F	49	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,1	Nég
NJE	F	43	23226	4,37	Neg	Pos	Pos	1,536	Nég
NJN			1078	3,03	Neg	Pos	Pos	1,507	Nég
NKA	F	35	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,054	Nég
NKN	M	17	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,01	Nég
NKO	M	26	24853	4,40	Neg	Pos	Pos	1,471	Nég
NKV	F	29	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,048	Pos
NKY	M	24	448	2,65	Neg	Pos	Pos	0,981	Nég
NNK	F	30	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,156	Nég
NOA	M	39	85	1,93			Pos	1,566	Nég
NOK	M	35	1267	3,10	Neg	Pos	Pos	1,431	Nég
OMA	M	73	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,176	Nég
ONA	M	19	29096	4,46	Neg	Neg	Pos	1,185	Nég
OTM	F	26	382	2,58			Pos	1,539	Nég
OUM	M	55	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,117	Nég
OWU	M	40	396	2,60	Neg	Pos	Pos	1,433	Nég
PEN	M	39	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,052	Pos
POH	M	50	184	2,26	Neg	Pos	Pos	1,82	Nég
POM	M	25	14325458	7,16	Neg	Pos	Pos	1,503	Nég
RAZ	M	36	17	1,23			Pos	1,573	Nég
SEM	M	18	380075	5,58	Neg	Neg	Pos	0,021	Pos
SEV		38	73970064	7,87	Neg	Neg	Pos	1,7	Nég
SIM	M		5085	3,71	Neg	Pos	Pos	1,018	Nég
SIT	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,11	Nég
SOA		11	48	1,68			Pos	1,698	Nég
SOG	M	19	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,069	Pos
SOL	F	28	201	2,30	Neg	Pos	Pos	1,582	Nég
SOP	F	24	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,185	Nég
TAA	F	28	133	2,12			Pos	1,379	Nég
TAB	F	35	738	2,87	Neg	Pos	Pos	1,444	Nég
TAE	M	46	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,396	Nég
TAK	M	47	762	2,88	Neg	Pos	Pos	1,339	Nég
TAN	M		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,127	Nég
TCF	M	27	1945	3,29	Neg	Pos	Pos	1,369	Nég
TCH	M	41	30305406	7,48	Neg	Pos	Pos	1,43	Nég
TCZ	M	29	386	2,59	Neg	Pos	Pos	1,438	Nég
TEE	F		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,288	Nég
TIE	M	42	110000000	8,04	Neg	Pos	Pos	1,445	Nég

TIG	M	49	150	2,18			Pos	1,494	Nég
TIW	F	20	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,06	Pos
TJO	F		12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,237	Nég
TNN	M	17	2018	3,30	Neg	Pos	Pos	1,603	Nég
TSA	M	47	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,13	Nég
TSG	F	25	120	2,08			Pos	1,363	Nég
TSI	F	52	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,134	Nég
TSJ	F	30	157	2,20			Pos	1,358	Nég
WAE	F	31	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,486	Nég
WAY	F	41	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,055	Nég
YAC		36	6400	3,81	Neg	Pos	Pos	1,617	Nég
YAY	M	44	391	2,59	Neg	Pos	Pos	1,6	Nég
YON	M	46	559	2,75			Pos	1,17	Nég
YOT			759	2,88	Neg	Pos	Pos	1,579	Nég
ZAP	M	33	12	1,08	Neg	Pos	Pos	1,279	Nég
ZEM	M	33	12	1,08	Neg	Pos	Pos	0,058	Pos
ZOT	M		6392034	6,81	Neg	Pos	Pos	1,428	Nég

Les données brutes de sérologies delta chez les pygmées porteurs de l'antigène de surface du VHB

Code	AGE	SEX	Ag Hbs	Tribu	Ac delta
LOBAK 15	26	M	3,5	Baka	Positif
BOBAK020	19	F	3,5	Baka	Positif
LOBAK 55	60	M	3,5	Baka	Positif
Bobak 202	75	M	3,5	Baka	Positif
PYG23	8	F	3,5	Babola	Négatif
BOBAK095	17	M	2,891	Baka	Positif
BOBAK112	24	F	3,238	Baka	Positif
BOBAK115	41	M	3,242	Baka	Positif
BOBAK118	35	M	3,08	Baka	Positif
BOBAK136	31	F	2,878	Baka	Positif
MEBAK 70	27	M	3,5	Baka	Positif
MEBAK 58	19	M	3,5	Baka	Positif
LOBAK 28	33	M	3,5	Baka	Positif
MEBAK 57	25	F	3,5	Baka	Positif
MEBAK 61	19	M	3,5	Baka	Positif
MEBAK 25	22	M	3,5	Baka	Positif
PYG70	12	F	3,5	Babola	Positif
PYG65	9	M	3,5	Babola	Positif
PYG56	10	M	3,5	Babola	Positif
PYG48	9	M	3,5	Babola	Positif
PYM 24	36	F	3,5	Medzan	Positif
PYM 38	34	M	2,95	Medzan	Positif
PYM 23	34	M	3,5	Medzan	Positif
LOBAK 16	52	F	3,5	Baka	Positif

LOBAk 47	43	M	3,5	Baka	Positif
LOBAK 40	34	M	3,5	Baka	Positif
PYG51	11	F	3,5	Babola	Négatif
BOBAK 226	60	F	3,5	Baka	Négatif
PYG42	8	M	2,815	Babola	Négatif
MEBAK 150	11	M	3,4	Baka	Négatif
MEBAK 116	19	F	1,081	Baka	Négatif
BOBAK138	39	M	2,888	Baka	Positif
BOBAK126	50	M	3,317	Baka	Positif
PYG58	8	F	3,057	Babola	Négatif
PYM 16	18	M	3,5	Medzan	Positif
PYM 45	25	M	3,489	Medzan	Positif
BOBAK065	49	F	>3,5	Baka	Positif
BOBAK 066			2.88	Baka	Négatif
PYM 14	23	M	3,5	Medzan	Positif
PYG96	7	M	3,5	Babola	Négatif
PYG40	8	M	3,5	Babola	Négatif
PYG60	8	F	3,5	Babola	Négatif
PYG44	9	M	3,5	Babola	Négatif
PYG92	9	M	3,5	Babola	Négatif
PYG97	9	F	3,6	Babola	Négatif
PYG98	10	F	3,7	Babola	Négatif
PYG62	11	M	1,353	Babola	Négatif
PYG68	11	M	3,5	Babola	Négatif
PYG99	11	F	3,8	Babola	Négatif
PYG61	12	M	3,5	Babola	Négatif
MEBAK 146	8	M	1,189	Baka	Négatif
MEBAK 154	8	F	3,5	Baka	Négatif
PYB 25	10	M	3,21	Baka	Négatif
Bobak 189	10	F	3,5	Baka	Positif
PYB 41	17	F	3,5	Baka	Négatif
PYB 13	18	F	3,273	Baka	Négatif
BOBAK086	20	M	3,119	Baka	Négatif
BOBAK051	23	M	3,5	Baka	Positif
BOBAK132	24	M	3,48	Baka	Positif
BOBAK017	25	F	3,5	Baka	Négatif
BOBAK013	28	F	3,499	Baka	Positif
PYB 29	30	F	3,171	Baka	Négatif
BOBAK083	34	M	2,769	Baka	Positif