

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DE PHARMACOLOGIE ET
TOXICOLOGIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY

OF PHARMACOLOGY AND
TOXYCOLOGY

**Cancers primitifs du foie au Cameroun :
Epidémiologie, étiologie virale et altérations
génétique**

THESE

Présentée en vue de l'obtention partielle du diplôme de Doctorat/PhD
en Biochimie


Par : AMOUGOU ATSAMA MARIE

Master en Biochimie

Sous la direction de
NJOUOM RICHARD, PhD/HDR
Directeur de Recherche
Chef de Service de Virologie, CPC
MOUNDIPA FEWOU PAUL, PhD
Professeur
Chef de Département de Biochimie, UYI

Année Académique : 2018-2019



| | | |
|--|---|---|
| UNIVERSITE DE YAOUNDE I FACULTE DES SCIENCES Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques |  | The University of Yaoundé I Faculty of Science Division of Programming and follow-up of Academic Affairs |
| LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS | LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF | |

**Liste des enseignants permanents de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I
ANNEE ACADEMIQUE 2018/2019**

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION : (Septembre 2018)

ADMINISTRATION

DOYEN : AWONO ONANA Charles, *Professeur*

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gidéon AGHAINDUM, *Maitre de Conférences*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche MBAZE MEVA'A Luc
Léonard, *Professeur*

| 1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (41) | | | |
|--|------------------------------|------------|----------------------------|
| N° | NOMS ET PRÉNOMS | GRADE | OBSERVATIONS |
| 1 | FEKAM BOYOM Fabrice | Professeur | En poste |
| 2 | MBACHAM FON Wilfred | Professeur | En poste |
| 3 | MOUNDIPA FEWOU Paul | Professeur | Chef de Département |
| 4 | NINTCHOM PENLAP V. épse BENG | Professeur | En poste |

| | | | |
|----|--------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 5 | OBEN Julius ENYONG | Professeur | En poste |
| 6 | ATOGHO Barbara Mma | Maître de Conférences | En poste |
| 7 | BELINGA née NDOYE FOE M. C. F. | Maître de Conférences | Chef DAF / FS |
| 8 | BIGOGA DIAGA Jude | Maître de Conférences | En poste |
| 9 | BOUDJEKO Thaddée | Maître de Conférences | En poste |
| 10 | EFFA NNOMO Pierre | Maître de Conférences | En poste |
| 11 | FOKOU Elie | Maître de Conférences | En poste |
| 12 | KANSCI Germain | Maître de Conférences | En poste |
| 13 | NANA Louise épouse WAKAM | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | NGONDI Judith Laure | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | NGUEFACK Julienne | Maître de Conférences | En poste |
| 16 | NJAYOU Frédéric Nico | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | ACHU Merci BIH | Chargée de Cours | En poste |
| 18 | DJOKAM TAMO Rosine | Chargée de Cours | <i>En disponibilité</i> |
| 19 | DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline | Chargée de Cours | En poste |
| 20 | DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane | Chargée de Cours | En poste |
| 21 | EVEHE BEBANDOUE Marie-Solange | Chargée de Cours | <i>En disponibilité</i> |
| 22 | EWANE Cécile Anne | Chargée de Cours | En poste |
| 23 | KOTUE KAPTUE Charles | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | LUNGA Paul KEILAH | Chargé de Cours | En poste |
| 25 | MBONG ANGIE M. Mary Anne | Chargée de Cours | En poste |
| 26 | MOFOR née TEUGWA Clotilde | Chargée de Cours | Inspecteur de Service MINESUP |
| 28 | Palmer MASUMBE NETONGO | Chargé de Cours | En poste |
| 29 | TCHANA KOUATCHOUA Angèle | Chargée de Cours | En poste |
| 30 | PACHANGOU NSANGO Sylvain | Chargé de Cours | En poste |
| 31 | DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|----|---------------------------------|------------------|----------|
| 32 | FONKOUA Martin | Chargé de Cours | En poste |
| 33 | BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie | Chargée de Cours | En poste |
| 34 | DAKOLE DABOY Charles | Chargée de Cours | En poste |
| 35 | MANANGA Marlyse Joséphine | Chargée de Cours | En poste |
| 36 | MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle | Assistante | En poste |
| 37 | BEBEE Fadimatou | Assistante | En poste |
| 38 | TIENTCHEU DJOKAM Leopold | Assistant | En poste |

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (44)

| | | | |
|----|------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 1 | BILONG BILONG Charles-Félix | Professeur | Chef de Département |
| 2 | DIMO Théophile | Professeur | En Poste |
| 3 | DJIETO LORDON Champlain | Professeur | En poste |
| 4 | ESSOMBA née NTSAMA MBALA | Professeur | <i>VDoyen/FMSB/UYI</i> |
| 5 | FOMENA Abraham | Professeur | En Poste |
| 6 | KAMTCHOUING Pierre | Professeur | EN POSTE |
| 7 | NJAMEN Dieudonné | Professeur | En poste |
| 8 | NJIOKOU Flobert | Professeur | En Poste |
| 9 | NOLA Moïse | Professeur | En poste |
| 10 | TAN Paul VERNYUY | Professeur | En poste |
| 11 | TCHUEM TCHUENTE Louis Albert | Professeur | <i>Coord. Progr. MINSANTE</i> |
| 12 | AJEAGAH Gidéon AGHAINDUM | Maître de Conférences | V/DSSE |
| 13 | DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | FOTO MENBOHAN Samuel | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | KAMGANG René | Maître de Conférences | <i>C.S. MINRESI</i> |
| 16 | KEKEUNOU Sévilor | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | MEGNEKOU Rosette | Maître de Conférences | En poste |

| | | | |
|----|---------------------------------|-----------------------|---------------|
| 18 | MONY Ruth épouse NTONE | Maître de Conférences | En Poste |
| 19 | TOMBI Jeannette | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert | Maître de Conférences | En poste |
| 21 | ALENE Désirée Chantal | Chargée de Cours | En poste |
| 22 | ATSAMO Albert Donatien | Chargée de Cours | En poste |
| 23 | BELLET EDIMO Oscar Roger | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | BILANDA Danielle Claude | Chargée de Cours | En poste |
| 25 | DJIOGUE Séfirin | Chargée de Cours | En poste |
| 26 | DONFACK Mireille | Chargée de Cours | En poste |
| 27 | GOUNOUE KAMKUMO Raceline | Chargée de Cours | En poste |
| 28 | LEKEUFACK FOLEFACK Guy B. | Chargé de Cours | En poste |
| 29 | MAHOB Raymond Joseph | Chargé de Cours | En poste |
| 30 | MBENOUN MASSE Paul Serge | Chargé de Cours | En poste |
| 31 | MOUNGANG LucianeMarlyse | Chargée de Cours | En poste |
| 32 | MVEYO NDANKEU Yves Patrick | Chargée de Cours | En poste |
| 33 | NGOULATEU KENFACK Omer Bébé | Chargé de Cours | En poste |
| 34 | NGUEGUIM TSOFAK Florence | Chargée de Cours | En poste |
| 35 | NGUEMBOK | Chargé de Cours | En poste |
| 36 | NJATSA Hermine épouse MEGAPTCHE | Chargée de Cours | En Poste |
| 37 | NJUA Clarisse Yafi | Chargée de Cours | CD/UBa |
| 38 | NOAH EWOTI Olive Vivien | Chargée de Cours | En poste |
| 39 | TADU Zephyrin | Chargée de Cours | En poste |
| 40 | YEDE | Chargée de Cours | En poste |
| 41 | ETEME ENAMA Serge | Assistant | En poste |
| 42 | KANDEDA KAVAYE Antoine | Assistant | En poste |
| 43 | KOGA MANG DOBARA | Assistant | En poste |

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (26)

| | | | |
|----|------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 1 | AMBANG Zachée | Professeur | Chef Division/UyII |
| 2 | BELL Joseph Martin | Professeur | En poste |
| 3 | YOUMBI Emmanuel | Professeur | Chef de Département |
| 4 | MOSSEBO Dominique Claude | Professeur | En poste |
| 5 | BIYE Elvire Hortense | Maître de Conférences | En poste |
| 6 | DJOCGOUE Pierre François | Maître de Conférences | En poste |
| 7 | KENGNE NOUMSI Ives Magloire | Maître de Conférences | En poste |
| 8 | MALA Armand William | Maître de Conférences | En poste |
| 9 | NDONGO BEKOLO | Maître de Conférences | <i>CE / MINRESI</i> |
| 10 | NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L. | Maître de Conférences | En poste |
| 11 | ZAPFACK Louis | Maître de Conférences | En poste |
| 12 | MBARGA BINDZI Marie Alain | Maître de Conférences | CT/Univ Dschang |
| 13 | MBOLO Marie | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | ANGONI Hyacinthe | Chargée de Cours | En poste |
| 15 | MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel | Chargé de Cours | En poste |
| 16 | ONANA JEAN MICHEL | Chargé de Cours | En poste |
| 17 | GOMANDJE Christelle | Chargée de Cours | En poste |
| 18 | NGODO MELINGUI Jean Baptiste | Chargé de Cours | En poste |
| 19 | NGALLE Hermine BILLE | Chargée de Cours | En poste |
| 20 | NGOOUO Lucas Vincent | Chargé de Cours | En poste |
| 21 | NSOM ZAMO Annie Claude épouse PIAL | Chargée de Cours | <i>Expert national /UNESCO</i> |
| 22 | TONFACK Libert Brice | Chargé de Cours | En poste |
| 23 | TSOATA Esaïe | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|----|----------------------------|------------|----------|
| 24 | DJEUANI Astride Carole | Assistante | En poste |
| 25 | MAFFO MAFFO Nicole Liliane | Assistante | En poste |
| 26 | NNANGA MEBENGA Ruth Laure | Assistante | En poste |
| 27 | NOUKEU KOUAKAM Armelle | Assistante | En poste |

4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.I.) (35)

| | | | |
|----|--------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 1 | KETCHA MBADCAM Joseph | Professeur | Chef de Département |
| 2 | NDIFON Peter TEKE | Professeur | <i>CT MINRESI</i> |
| 3 | NGAMENI Emmanuel | Professeur | <i>Doyen/ UD</i> |
| 4 | GHOGOMU Paul MINGO | Professeur | <i>Directeur Cabinet PM</i> |
| 5 | LAMINSI Samuel | Professeur | En poste |
| 6 | MELO née CHINJE Uphie F. | Professeur | <i>Recteur/UN</i> |
| 7 | AGWARA ONDOH Moïse | Professeur | <i>Vice-Recteur/ Ubda</i> |
| 8 | NANSEU Charles Péguy | Professeur | En poste |
| 9 | NENWA Justin | Professeur | En poste |
| 10 | BABALE DJAM DOUDOU | Maître de Conférences | En poste |
| 11 | DJOUFAC WOUMFO Emmanuel | Maître de Conférences | En poste |
| 12 | ELIMBI Antoine | Maître de Conférences | En poste |
| 13 | KONG SAKEO | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | NDIKONTAR Maurice KOR | Maître de Conférences | <i>Vice-Doyen/Ubda</i> |
| 15 | NGOMO Horace MANGA | Maître de Conférences | <i>Recteur /UB</i> |
| 16 | YOUNANG Elie | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | ACAYANKA Elie | Chargé de Cours | En poste |
| 18 | CHEUMANI YONA Arnaud | Chargé de Cours | En poste |
| 19 | EMADACK Alphonse | Chargé de Cours | En poste |
| 20 | GWET Simon – Pierre | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|----|----------------------------------|-----------------|----------|
| 21 | KAMGANG YOUNI Georges | Chargé de Cours | En poste |
| 22 | KEUMEGNE MBOUGUEM Jean Claude | Chargé de Cours | En poste |
| 23 | KENNE DEDZO Gustave | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | MBEY Jean Aimé | Chargé de Cours | En poste |
| 25 | NDI Julius NSAMI | Chargé de Cours | En poste |
| 26 | NDOSIRI Bridget NDOYE | Chargé de Cours | En poste |
| 27 | NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG | Chargé de Cours | En poste |
| 28 | NJOYA Dayirou | Chargé de Cours | En poste |
| 29 | NYAMEN Linda Dyorisse | Chargé de Cours | En poste |
| 30 | PABOUDAM GBAMBIE Awaou | Chargé de Cours | En poste |
| 31 | TCHAKOUTE KOUAMO Hervé | Chargé de Cours | En poste |
| 32 | BELIBI BELIBI Placide Désiré | Assistant | En poste |
| 33 | KOUOTOU DAOUDA | Assistant | En poste |
| 34 | MAKON Thomas Beauregar | Assistant | En poste |
| 35 | NCHIMI NONO Katia | Assistant | En poste |

5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (33)

| | | | |
|---|-----------------------------|------------|-------------------------------------|
| 1 | DONGO Etienne | Professeur | Vice-Doyen/ DPSSA |
| 2 | GHOGOMU TIH ROBERT RALPH | Professeur | <i>Directeur I.B.A. Foumban</i> |
| 3 | MBAFOR Joseph | Professeur | En poste |
| 4 | NGADJUI TCHALEU B. | Professeur | <i>Chef de dépt FMBS</i> |
| 5 | NGOUELA Silvère Augustin | Professeur | <i>Chef de dépt. Uds</i> |
| 6 | NKENGFACK Augustin Ephrem | Professeur | Chef de Département |
| 7 | NYASSE Barthélemy | Professeur | <i>Directeur /UN</i> |
| 8 | PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel | Professeur | <i>Directeur au MINESUP</i> |

| | | | |
|---|---------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 9 | WANDJI Jean | Professeur | En poste |
| 10 | Alex de Théodore ATCHADE | Maître de Conférences | <i>DEPE/ UYI</i> |
| 11 | FOLEFOC Gabriel NGOSONG | Maître de Conférences | En poste |
| 12 | KEUMEDJIO Félix | Maître de Conférences | En poste |
| 13 | KOUAM Jacques | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | MBAZOA née DJAMA Céline | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | NOUNGOUE TCHAMO Diderot | Maître de Conférences | En poste |
| 16 | TCHOUANKEU Jean-Claude | Maître de Conférences | <i>Vice-Recteur/ UYII</i> |
| 17 | YANKEP Emmanuel | Maître de Conférences | En poste |
| 18 | TCHUENDEM KENMOGNE Marguerite | Maître de Conférences | En poste |
| 19 | TIH née NGO BILONG E. Anastasie | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | AMBASSA Pantaleon | Chargé de Cours | En poste |
| 21 | EYONG Kenneth OBEN | Chargé de Cours | En poste |
| 22 | FOTSO WABO Ghislain | Chargé de Cours | En poste |
| 23 | KAMTO Eutrophe Ledoux | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | MKOUNGA Pierre | Chargé de Cours | En poste |
| 25 | NGO MBING Joséphine | Chargé de Cours | En poste |
| 26 | NGONO BIKOBO Dominique Serge | Chargé de Cours | Chef Cell/ MINRESI |
| 27 | NOTE LOUGBOT Olivier | Chargé de Cours | CEA/MINESUP |
| 28 | OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse | Chargé de Cours | En poste |
| 29 | TABOPDA KUATE Turibio | Chargé de Cours | En poste |
| 30 | TAGATSING FOTSING Maurice | Chargé de Cours | En poste |
| 31 | ZONDEGOUNBA Ernestine | Chargé de Cours | En poste |
| 32 | NGINTEDO Dominique | Assistant | En poste |
| 33 | NGOMO Orléans | Assistant | En poste |
| 6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (30) | | | |
| 1 | FOUDA NDJODO Marcel | Professeur | <i>IGA-MINESUP/Chef Dpt ENS</i> |

| | | | |
|----|---------------------------------|-----------------------|--|
| 2 | ATSA ETOUNDI Roger | Professeur | Chef de Département <i>Chef Division MINESUP</i> |
| 3 | NDOUNDAM René | Maître de Conférences | En poste |
| 4 | CHEDOM FOTSO Donatien | Chargé de Cours | En poste |
| 5 | DJAM Xaviera Youth KIMBI | Chargé de Cours | En poste |
| 6 | KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin | Chargé de Cours | En poste |
| 7 | MELATAGIA YONTA Paulin | Chargé de Cours | En poste |
| 8 | MOTO MPONG Serge Alain | Chargé de Cours | En poste |
| 9 | TINDO Gilbert | Chargé de Cours | En poste |
| 10 | TSOPZE Norbert | Chargé de Cours | En poste |
| 11 | WAKU KOUAMOU Jules | Chargé de Cours | En poste |
| 12 | ABESSOLO ALO'O Gislain | Assistant | En poste |
| 13 | AMINOUE Halilou | Assistant | En poste |
| 14 | BAYEM Jacques Narcisse | Assistant | En poste |
| 15 | DOMGA KOMGUEM Rodrigue | Assistant | En poste |
| 16 | EBELE Serge | Assistant | En poste |
| 17 | HAMZA Adamou | Assistant | En poste |
| 18 | KAMDEM KENGNE Christiane | Assistant | En poste |
| 19 | KAMGUEU Patrick Olivier | Assistant | En poste |
| 20 | JIOMEKONG AZANZI Fidel | Assistant | En poste |
| 21 | MAKEMBE S. Fritz Oswald | Assistant | En poste |
| 22 | MEYEMDOU Nadège Sylvianne | Assistant | En poste |
| 23 | MONTHE DJIADEU Valery Martial | Assistant | En poste |
| 24 | NKONDOCK MI BAHANACK Nicolas | Assistant | En poste |
| 25 | OLE OLE David Claude | Assistant | En poste |
| 26 | TAPAMO KENFACK Hyppolite | Assistant | En poste |

7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (33)

| | | | |
|----|-------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | BEKOLLE David | Professeur | <i>Vice-Recteur UN</i> |
| 2 | BITJONG NDOMBOL | Professeur | En poste |
| 3 | DOSSA COSSY Marcel | Professeur | En poste |
| 4 | AYISSI Raoult Domingo | Maître de Conférences | Chef de Département |
| 5 | EMVUDU WONO Yves S. | Maître de Conférences | Dir.MINESUP |
| 6 | NKUIIMI JUGNIA Célestin | Maître de Conférences | En poste |
| 7 | NOUNDJEU Pierre | Maître de Conférences | En poste |
| 8 | AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard | Chargé de Cours | C.E. MINEPAT |
| 9 | BOGSO Antoine M | Chargé de Cours | En poste |
| 10 | CHENDJOU Gilbert | Chargé de Cours | En poste |
| 11 | DOUANLA YONTA Hermann | Chargé de Cours | En poste |
| 12 | FOMEKONG Christophe | Chargé de Cours | En poste |
| 13 | KIANPI Maurice | Chargé de Cours | En poste |
| 14 | KIKI Maxime Armand | Chargé de Cours | En poste |
| 15 | MBAKOP Guy Merlin | Chargé de Cours | En poste |
| 16 | MBANG Joseph | Chargé de Cours | En poste |
| 17 | MBEHOU Mohamed | Chargé de Cours | En poste |
| 18 | MBELE BEDIMA Martin | Chargé de Cours | En poste |
| 19 | MENGUE MENGUE David Joe | Chargé de Cours | En poste |
| 20 | NGUEFACK Bertrand | Chargé de Cours | En poste |
| 21 | POLA DOUNDOU Emmanuel | Chargé de Cours | En poste |
| 22 | TAKAM SOH Patrice | Chargé de Cours | En poste |
| 23 | TCHANGANG Roger Duclos | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | TCHOUNDJA Edgar Landry | Chargé de Cours | En poste |
| 25 | TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie | Chargé de Cours | En poste |
| 26 | DJIADEU NGAHA Michel | Assistant | En poste |
| 27 | MBIAKOP Hilaire George | Assistant | En poste |
| 28 | NIMPA PEFOUKEU Romain | Assistant | En poste |

| | | | |
|---|-----------------------------------|-----------------------|--|
| 29 | TANG AHANDA Barnabé | Assistant | <i>Chef Serv. MINPLAMAT</i> |
| 30 | TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin Erick | Assistant | En poste |
| 8-DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13) | | | |
| 1 | ETOA François-Xavier | Professeur | Recteur UDO/Chef de Département |
| 2 | BOYOMO ONANA | Maître de Conférences | En poste |
| 3 | ESSIA NGANG Jean Justin | Maître de Conférences | <i>Chef de Division recherche IMPM</i> |
| 4 | NYEGUE Maximilienne Ascension | Maître de Conférences | En poste |
| 5 | NWAGA Dieudonné M. | Maître de Conférences | En poste |
| 6 | RIWOM Sara Honorine | Maître de Conférences | En poste |
| 7 | SADO KAMDEM Sylvain Leroy | Maître de Conférences | En poste |
| 8 | BODA Maurice | Chargé de Cours | En poste |
| 9 | ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel | Chargé de Cours | En poste |
| 10 | BOUGNOM Blaise Pascal | Chargé de Cours | En poste |
| 11 | NJIKI BIKOÏ Jacky | Assistant | En poste |
| 12 | TCHIKOUA Roger | Assistant | En poste |
| 9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (41) | | | |
| 1 | ESSIMBI ZOBO Bernard | Professeur | En poste |
| 2 | KOFANE Timoléon Crépin | Professeur | En poste |
| 3 | NJOMO Donatien | Professeur | En poste |
| 4 | TABOD Charles TABOD | Professeur | <i>Doyen/Ubda</i> |
| 5 | WOAFO Paul | Professeur | En poste |
| 6 | NDJAKA Jean Marie Bienvenu | Professeur | Chef de Département |
| 7 | PEMHA Elkana | Professeur | En poste |
| 8 | TCHAWOUA Clément | Professeur | En poste |

| | | | |
|----|---|-----------------------|--|
| 9 | BIYA MOTTO Frédéric | Maître de Conférences | <i>Dir.Gén. B. MEKIM</i> |
| 10 | BEN- BOLIE Germain Hubert | Maître de Conférences | En poste |
| 11 | DJUIDJE KENMOE Gemaine épouse ALOYEM KAZE | Maître de Conférences | En poste |
| 12 | EKOBENA FOU DA Henri Paul | Maître de Conférences | <i>Chef Dépt UN</i> |
| 13 | EYEBE FOU DA Jean Sire | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | FEWO Serge Ibraïd | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | MBANE BIOUELE | Maître de Conférences | <i>En poste</i> |
| 16 | NANA NBENDJO Blaise | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | NJANDJOCK NOUCK Philippe | Maître de Conférences | <i>Chef Serv. MINRESI</i> |
| 18 | NOUAYOU Robert | Maître de Conférences | En poste |
| 19 | OUMAROU BOUBA | Maître de Conférences | <i>En poste</i> |
| 20 | SAIDOU | Maître de Conférences | <i>En poste</i> |
| 21 | SIEWE SIEWE Martin | Maître de Conférences | En poste |
| 22 | ZEKENG Serge Sylvain | Maître de Conférences | En poste |
| 23 | BODO Bernard | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | ENYEGUE A NYAM Françoise épouse BELINGA | Chargé de Cours | En poste |
| 25 | EDONGUE HERVAIS | Chargé de Cours | En poste |
| 26 | FOUEDJIO David | Chargé de Cours | <i>Chef Cellule MINADER</i> |
| 27 | HONA Jacques | Chargé de Cours | En poste |
| 28 | MBINACK Clément | Chargé de Cours | En Poste |
| 29 | MBONO SAMBA Yves Christian U. | Chargé de Cours | En poste |
| 30 | NDOP Joseph | Chargé de Cours | En poste |
| 31 | OBOUNOU Marcel | Chargé de Cours | <i>Dir.acad/Univ.I nt.Etat Cam-Congo</i> |
| 32 | SIMO Elie | Chargé de Cours | En poste |
| 33 | TABI Conrad Bertrand | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|--|------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 34 | TCHOFFO Fidèle | Chargé de Cours | En poste |
| 35 | VONDOU DERBETINI Appolinaire | Chargé de Cours | En Poste |
| 36 | WAKATA née BEYA Annie | Chargé de Cours | <i>Chef Serv. MINESUP</i> |
| 37 | WOULACHE Rosalie Laure | Chargé de Cours | En poste |
| 38 | ABDOURAHIMI | Assistant | En Poste |
| 39 | CHAMANI Roméo | Assistant | En Poste |
| 40 | MELI'I Jorelle Larissa | Assistant | En Poste |
| 41 | MVOGO Alain | Assistant | En Poste |
| 10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (44) | | | |
| 1 | NDJIGUI Paul-Désiré | Professeur | Chef de Department |
| 2 | NZENTI Jean-Paul | Professeur | En poste |
| 3 | BITOM Dieudonné Lucien | Professeur | Doyen FASA/ U D |
| 4 | FOUATEU Rose épouse YONGUE | Maître de Conférences | En poste |
| 5 | KAMGANG Pierre | Maître de Conférences | En poste |
| 6 | MEDJO EKO Robert | Maître de Conférences | Conseiller Technique/UYII |
| 7 | MOUNDI Amidou | Maître de Conférences | <i>CT/MINMIDT</i> |
| 8 | NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy | Maître de Conférences | En poste |
| 9 | NGOS III Simon | Maître de Conférences | <i>D.A.A.C./UM</i> |
| 10 | NJILAH Isaac KONFOR | Maître de Conférences | En poste |
| 11 | NKOUMBOU Charles | Maître de Conférences | En poste |
| 12 | TEMDJIM Robert | Maître de Conférences | En poste |
| 13 | YENE ATANGANA Joseph Q. | Maître de Conférences | <i>Chef de Divi/ MINTP</i> |
| 14 | ABOSSOLO née ANGUE Monique | Chargé de Cours | Chef DAASR FS/UYI |
| 15 | BEKOA Etienne | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 16 | BISSO Dieudonné | Chargé de Cours | <i>Dir. Projet Barage Memve'ele</i> |

| | | | |
|----|----------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| 17 | EKOMANE Emile | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 18 | ESSONO Jean | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 19 | EYONG John TAKEM | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 20 | FUH Calistus Gentry | Chargé de Cours | <i>Serv D'ETAT /MINMIDT</i> |
| 21 | GANNO Sylvestre | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 22 | GHOGOMU Richard TANWI | Chargé de Cours | <i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i> |
| 23 | LAMILEN BILLA Daniel | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 24 | MBIDA YEM | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 25 | MINYEM Dieudonné | Chargé de Cours | <i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i> |
| 26 | MOUAFO Lucas | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 27 | NGO BELNOUN Rose Noël | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 28 | NGO BIDJECK Louise Marie | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 29 | NGUEUTCHOUA Gabriel | Chargé de Cours | <i>CEA MINRESI</i> |
| 30 | NYECK Bruno | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 31 | ONANA Vincent | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 32 | TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NUMBEM | Chargé de cours | <i>CEA MINRESI</i> |
| 33 | TCHOUANKOUE Jean-Pierre | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 34 | ZO'O ZAME Philémon | Chargé de Cours | <i>DG ART</i> |
| 35 | TEMGA Jean Pierre | Chargé de Cours | <i>En poste</i> |
| 36 | ANABA ONANA Achille Basile | Assistant | <i>En Poste</i> |
| 37 | BINELI BETSI Thierry Olivier | Assistant | <i>En Poste</i> |
| 38 | METANG Victor | Assistant | <i>En poste</i> |
| 39 | NOMO NEGUE Emmanuel | Assistant | <i>En poste</i> |
| 40 | SABABA Elisé | Assistant | <i>En Poste</i> |
| 41 | TCHAPCHET TCHATO De Pesquidoux I | Assistant | <i>En poste</i> |
| 42 | TEHNA Nathanaël | Assistant | <i>En poste</i> |

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS

| DÉPARTEMENT | Professeurs | Maîtres de Conférences | Chargés de Cours | Assistants | Total |
|--------------|---------------|------------------------|------------------|---------------|----------------|
| B.C. | 5 (1) | 10 (5) | 20 (10) | 3 (1) | 39 (16) |
| B.P.A. | 11 (1) | 9 (3) | 20 (8) | 3 (5) | 43 (17) |
| B.P.V. | 4 (0) | 9(2) | 10 (2) | 4 (4) | 27 (8) |
| C.I. | 9(1) | 8(2) | 16 (4) | 0 (2) | 33 (9) |
| C.O. | 8 (0) | 13 (3) | 8 (2) | 1 (0) | 30 (5) |
| I.N. | 3 (0) | 1 (0) | 8 (0) | 12 (3) | 24 (3) |
| M.A. | 3 (0) | 5 (0) | 18 (1) | 4 (0) | 30 (1) |
| M.B. | 2 (0) | 5 (2) | 6 (2) | 0 (0) | 13 (4) |
| P.H. | 8 (0) | 17 (0) | 15 (2) | 2 (1) | 42 (3) |
| S.T. | 5 (0) | 15 (2) | 22 (3) | 2 (0) | 44 (5) |
| Total | 58 (3) | 92(19) | 144 (33) | 31(16) | 325(71) |

Soit un total de **325(71)** dont :

- Professeurs **58 (3)**
- Maîtres de Conférences **92 (19)**
- Chargés de Cours **144 (33)**
- Assistants **31 (16)**

() = Nombre de Femmes

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à tous les membres de ma famille!

REMERCIEMENTS

Ma profonde gratitude s'adresse:

- Au **Pr Richard Njouom** mon Directeur de thèse sans qui ces travaux n'auraient pas pu avoir lieu. Merci de m'avoir accueilli dans votre service et au sein de votre équipe dans un sujet de travail si différent. Je vous remercie encore de l'intérêt que vous avez porté à mes travaux, pour tous les encouragements que vous m'avez donnés tout au long de son évolution et surtout votre suivi avec rigueur scientifique. Malgré vos nombreuses occupations, vous avez su me consacrer votre temps pour l'aboutissement de ce travail;
- Au **Pr Moundipa Fewou Paul** mon Superviseur, qui m'a accueilli dans son Laboratoire depuis ma période d'initiation à la recherche, vous avez toujours été pour moi à la fois un parent et un formateur. Malgré vos multiples occupations au Département, vous avez su à chaque fois que besoin se présentait me consacrer votre temps et votre grande attention pour la réalisation de ce travail. Vous n'avez ménagé aucun effort pour m'inculquer votre esprit du travail bien fait et d'endurance;
- A toute l'équipe de « l'Organisation Nucléaire et Oncogénèse de l'Institut Pasteur de Paris » de m'avoir accueilli pour la réalisation de la partie génétique de ce travail. Merci particulièrement au **Dr Pascal Pineau** et **Agnès Marchio** qui m'ont accordé leur suivi avec grande attention et n'ont jamais hésité à me rendre n'importe quel service. Malgré la longue distance, vous avez toujours été la solution à toutes mes diverses préoccupations;
- Aux Dr Paul Jean Adrien Atangana (Anatomopathologiste au Centre Pasteur du Cameroun), Pr Noah Noah Domminique (Gastro-entérologue à l'Hôpital Central de Yaoundé), Pr Ongolo Zogo Pierre (Radiologue à l'hôpital Central de Yaoundé), et tous les médecins et infirmier(e)s du Service de Gastro-entérologie de l'hôpital Central de Yaoundé pour leur forte implication dans la mise en œuvre de ce travail.
- A la Direction Générale, Scientifique, Médicale et des Affaires administratives et Financières du Centre Pasteur du Cameroun pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mes travaux dans un Laboratoire de Référence hautement sophistiqué;
- A tous les enseignements du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I, pour la formation académique reçue;

- A chacun des membres de ce jury de thèse, c'est un grand honneur de soumettre mon travail à votre regard Scientifique;
- A l'ensemble des cadres scientifiques du Service de virologie: **Dr Serge Alain Sadeuh-Mba, Dr Paul Alain Tagnoukam Ngoupo, Dr Maurice Demanou, Dr Laure Ngono, Dr Matthieu Schoenhals, Marie Claire Endegue Zanga**; à tous les étudiants du Service de Virologie et du Laboratoire de Paludisme et tous les Techniciens de Laboratoire du CPC pour vos remarques, suggestions, expertises et multiples encouragements lors de la réalisation de ce travail;
- A toute l'équipe du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'Université de Yaoundé I pour les conseils et remarques qu'ils m'ont prodigués lors des différentes présentations en séminaires;
- Au **Dr Foupouapouognigni Yacouba** pour les conseils en Biologie moléculaire et les entretiens permanents;
- A mes amis Paul Alain, Elodie et Berthold qui m'ont remonté le moral à tout moment;
- A **Mr Ndioma Séraphin, Mme Fubis, Mr Martin Vital Atangana** pour leurs conseils et soutien multiformes;
- A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et dont je n'ai pas pu citer les noms, qu'ils soient rassurés de ma profonde gratitude.

TABLE DE MATIERES

| | |
|---|------------------------------------|
| Liste des enseignants permanents de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I..... | i |
| LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS | i |
| DEDICACES..... | xvi |
| REMERCIEMENTS | xvii |
| LISTE DES TABLEAUX | xxix |
| LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES | Erreur ! Signet non défini. |
| RESUME..... | xxx |
| INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
| CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE | 4 |
| I.1 Généralités sur le foie humain..... | 4 |
| I.1.1 Anatomie et histologie | 4 |
| I.1.2 Les différents types cellulaires et fonctions hépatiques | 5 |
| I.2 Généralités sur les cancers | 5 |
| I.2.1 Définition et différents types de cancers du foie..... | 7 |
| I.2.2 Différents types de cancers primaires du foie | 7 |
| I.3 Le carcinome hépatocellulaire | 7 |
| I.3.1 Epidémiologie descriptive..... | 7 |
| I.3.2 Facteurs de risque..... | 9 |
| I.3.2.1 Facteurs de risque viraux | 10 |
| I.3.2.1.1 Le virus de l'hépatite B..... | 10 |
| I.3.2.1.1.1 Historique de la découverte..... | 10 |
| I.3.2.1.1.2 Taxonomie du virus de l'hépatite B..... | 10 |
| I.3.2.1.1.4 Propriétés physico-chimiques du virus de l'hépatite B..... | 11 |
| I.3.2.1.1.5 Organisation génomique du virus de l'hépatite B..... | 12 |
| I.3.2.1.1.6 Structure et fonctions des protéines virales..... | 13 |
| I.3.2.1.1.7 Le cycle de multiplication du virus de l'hépatite B | 14 |
| I.3.2.1.1.8 La variabilité génétique du virus de l'hépatite B | 16 |
| I.3.2.1.1.9 Epidémiologie du virus de l'hépatite B..... | 20 |
| I.3.2.1.1.10 Physiopathologie de l'infection par le virus de l'hépatite B | 20 |
| I.3.2.1.1.12 Virus de l'hépatite B et carcinome hépatocellulaire | 24 |
| I.3.2.1.2 Le virus de l'hépatite C..... | 25 |
| I.3.2.1.2.1 Historique de la découverte..... | 25 |

| | |
|---|----|
| I.3.2.1.2.2 Classification et structure du virus de l'hépatite C..... | 26 |
| I.3.2.1.2.3 Structure du génome du virus de l'hépatite C | 27 |
| I.3.2.1.2.4 Propriétés physico-chimiques du virus de l'hépatite C..... | 27 |
| I.3.2.1.2.5 Organisation génomique du virus de l'hépatite C | 27 |
| I.3.2.1.2.6 Le cycle de multiplication du virus de l'hépatite C | 31 |
| I.3.2.1.2.1.7 La variabilité génétique du virus de l'hépatite C | 31 |
| I.3.2.1.2.7 La variabilité génétique du virus de l'hépatite C | 32 |
| I.3.2.1.2.8 Epidémiologie du virus de l'hépatite C..... | 34 |
| I.3.2.1.2.9 Physiopathologie de l'infection par le virus de l'hépatite C | 35 |
| I.3.2.1.2.10 Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C | 37 |
| I.3.2.1.2.11 Diagnostic virologique de l'hépatite virale C | 37 |
| I.3.2.1.2.12 Traitements de l'hépatite virale C | 40 |
| I.3.2.1.2.13 Prévention de l'hépatite virale C..... | 40 |
| I.3.2.1.2.14 Hépatite virale C et carcinome hépatocellulaire..... | 40 |
| I.3.2.1.3 Le virus de l'hépatite Delta ou agent Delta..... | 41 |
| I.3.2.1.3.1 Historique de la découverte..... | 41 |
| I.3.2.1.3.2 Structure du virion..... | 41 |
| I.3.2.1.3.3 Organisation génomique | 42 |
| I.3.2.1.3.4 Cycle de multiplication du VHD..... | 43 |
| I.3.2.1.3.5 Les protéines virales..... | 44 |
| I.3.2.1.3.6 Variabilité génétique | 44 |
| I.3.2.1.3.7 Epidémiologie | 46 |
| I.3.2.1.3.8 Pouvoir pathogène..... | 47 |
| I.3.2.1.3.9 Diagnostic | 48 |
| I.3.2.1.3.10 Traitement et prévention | 49 |
| I.3.2.1.3.11 VHD et carcinome hépatocellulaire | 49 |
| I.3.2.1.4. Le virus de l'hépatite E | 50 |
| I.3.2.1.4.1 Historique..... | 50 |
| I.3.2.1.4.2 Taxonomie et structure..... | 50 |
| I.3.2.1.4.3 Les caractéristiques physico-chimiques | 50 |
| I.3.2.1.4.4 Organisation génomique | 50 |
| I.3.2.1.4.5 Cycle de réplication..... | 52 |
| I.3.2.1.4.6 Pouvoir pathogène..... | 53 |
| I.3.2.1.4.7 Voies de transmission | 53 |

| | |
|--|----|
| I.3.2.1.4.8 Epidémiologie du virus de l'hépatite E | 53 |
| I.3.2.1.4.9 Présentation clinique du VHE | 54 |
| I.3.2.1.4.10 Traitement et prophylaxie | 55 |
| I.3.2.1.4.11 Diagnostic biologique | 56 |
| I.3.3 Altérations génétiques du carcinome hépatocellulaire | 56 |
| I.3.4 Mécanisme moléculaire de l'hépatocarcinogénèse | 62 |
| I.3.5 Surveillance, diagnostic et traitement du carcinome hépatocellulaire | 65 |
| I.3.6 CHC au Cameroun : Problématique et objectifs du travail | 67 |
| II.1. Type d'étude | 69 |
| II.2. Sites de recrutement | 69 |
| II.3. Populations d'étude | 69 |
| II.3.1 Critères d'éligibilité et d'inclusion des patients | 70 |
| II.3.2 Critères d'exclusion des patients | 70 |
| II.4. Echantillonnage | 70 |
| II.4.1 Type d'échantillonnage | 70 |
| II.4.2 Taille d'échantillon | 71 |
| II.5 Questionnaire | 71 |
| II.6 Consideration éthique | 71 |
| II.7 Prélèvements | 72 |
| II.8 Les tests sérologiques | 72 |
| II.8.1 Sérologie hépatite C | 72 |
| II.8.2 Sérologie hépatite B | 73 |
| II.8.2.1 Détection des antigènes de surface du VHB | 73 |
| II.8.2.2 Détection des anticorps totaux qui sont dirigés contre les antigènes de surface du virus de l'hépatite B (anti-HBs) | 74 |
| II.8.2.3 Détection des anticorps totaux dirigés contre l'antigène core du virus de l'hépatite B (Anti-HBc) | 75 |
| II.8.2.4 Détection des antigènes e du virus de l'hépatite B (AgHBe) | 76 |
| II.8.3 Sérologie hépatite Delta ou D | 77 |
| II.8.4 Sérologie hépatite E | 78 |
| II.9 Les tests de biologie moléculaire | 79 |
| II.9.1 Détermination quantitative de l'ARN du VHC | 79 |
| II.9.1.1 Extraction de l'ARN du VHC | 80 |
| II.9.1.2 Quantification de l'ARN du VHC | 80 |
| II.9.2 Détermination quantitative de l'ADN du VHB | 81 |

| | | |
|-----------------|--|-----|
| II.9.3 | Génotypage du VHC..... | 83 |
| II.9.4 | Génotypage du VHB..... | 89 |
| II.9.5 | Analyse mutationnelle | 92 |
| II.9.6 | Identification des altérations génétiques circulant associées au développement du CHC..... | 93 |
| II.9.6.1 | Extraction de l'ADN..... | 94 |
| II.9.6.2 | Quantification des acides nucléiques..... | 94 |
| II.9.6.3 | Evaluation de l'intégrité de l'ADN et du rendement d'extraction..... | 95 |
| II.9.6.4.1 | Quantification du taux d'ADN mitochondrial | 97 |
| II.9.6.4.3 | Identification de la mutation R249S du gène p53..... | 98 |
| II.9.6.4.4 | Identification du polymorphisme du codon 72 du gène p53 (SNP R72P)..... | 99 |
| II.9.6.5 | Analyses statistiques | 100 |
| III.1.1.1. | Partie rétrospective | 101 |
| III.1.1.1.1. | Caractéristiques des patients inclus | 101 |
| III.1.1.1.2. | Incidence des différents types de cancers du foie..... | 101 |
| III.1.1.1.3. | Etiologie des différents types de cancers primitifs répertoriés..... | 101 |
| III.1.1.2. | Partie prospective | 103 |
| III.1.1.2.2. | Séroprévalences des hépatites B, C et Delta chez les Cas et les témoins | 104 |
| III.1.1.2.3. | Evaluation du risque associé à l'infection par les hépatites B, C, D et le CHC | 106 |
| III.1.1.2.4. | Distribution des charges virales hépatite B et C chez les cas et les témoins 1 | 110 |
| III.1.1.2.5. | Identification de l'effet de la charge virale, les différents génotypes et mutations des virus de l'hépatite B et C sur le développement du CHC..... | 110 |
| III.1.1.2.5.1 | Influence de la charge virale VHB sur le développement du CHC..... | 111 |
| III.1.1.2.5.2 | Influence de la charge virale hépatite C sur le développement du CHC | 111 |
| III.1.1.2.5.3 | Influence des génotypes du VHB sur le développement du CHC..... | 112 |
| III.1.1.2.5.4 | Influence des génotypes du VHC sur le développement du CHC..... | 112 |
| III.1.1.2.5.5 | Influence des mutations du VHC sur le développement du CHC | 116 |
| III.1.1.2.6.5 | Influence des mutations du VHB sur le développement du CHC | 122 |
| III.1.1.2.6.7 | Altérations génétiques associées au développement du CHC | 124 |
| III.1.1.2.6.7.1 | Quantification du taux d'ADN mitochondrial chez les cas et les témoins | 125 |
| III.1.1.2.6.7.2 | Haplogroupes mitochondriaux comme facteurs de susceptibilité au CHC. | 125 |
| III.1.1.2.6.7.3 | Influence du polymorphisme mono nucléotidique du codon 72 du gène p53 sur le développement du CHC (SNP R72P)..... | 126 |
| III.1.1.2.6.7.4 | Rôle de la mutation R249S du gène p53 sur le développement du CHC. | 127 |
| III.2 | DISCUSSION | 128 |
| | PERSPECTIVES..... | 136 |

| | |
|--|-----|
| REFERENCES | 1 |
| ANNEXES | I |
| ANNEXE 1: Exemple de questionnaire standardisé | I |
| ANNEXE 2: Considération éthique | III |
| ANNEXE 3 : Autorisation administrative..... | IV |
| ANNEXE 4 : Préparation des solutions | V |

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

AA: Acide aminé

AAV2: ADN Adeno-associated virus type 2

Ac: Anticorps

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNccc: ADN circulaire covalamment clos

ADNmt: ADN mitochondriale

AFP: Alpha Foeto protéine

Ag: Antigène

AgHBc: Antigène core ou capsid du virus de l'hépatite B

AgHBe: Antigène « e » ou de l'enveloppe du virus de 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)

Anti-VHC: Anticorps dirgé contre le virus de l'hépatite Delta

Anti-VHD: Anticorps dirigé contre le virus de l'hépatite C

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ARNpg: Acide ribonucléique pré-génomique

ARNt: ARN de transfert

ASAT: Aspartate Aminotransférase

BET: Bromure d'éthidium

CHC: Carcinome Hépatocellulaire

CPC: Centre Pasteur du Cameroun

CTNNB1: Oncogène de la Béta-caténine

DCP: Des-Gamma carboxyprothrombin

DHBV: Duck Hepatitis B Virus (virus de l'hépatite B du canard)

DNTPs: Désoxynucléotides triphosphates (ATP, TTP, CTP, GTP)

EDTA: Ethylen-Diamine-Tetra-Acetic acid

ELISA: Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay

GiHBV: Gibbon Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B du Gibbon)

GoHBV: Gorilla Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B du Gorille)

Gp: Glycoprotéine

GSHBV: Ground Squirrel Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B de l'écureuil)

HAS: Haute autorité de Santé

HBx: Protéine X du virus de l'hépatite B

HHBV: Heron Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B du héron)

HLA: Human Leucocyt Antigen (Antigène de Leucocytes Humains)

HVR1: Hyper Variable region (Region Hyper variable)

IFN α : Interféron-alpha

IgG: Immunoglobuline de type G

IgHB: Immunoglobuline spécifique anti-HBs

IgM: Immunoglobuline de type M

Kb: Kilobase

KDa: Kilodalton

LDL: Low Density Lipoprotein

LHD: Large Hepatitis Delta Virus protein (Grande protéine du virus de l'hépatite Delta)

MAP-Kinase: Mitogen activated protein kinase

MgCl₂: Chlorure de Magnésium

miRNA: Micro RNA

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ORF: Open Reading Frame (Cadre de lecture ouverte)

OuHBV: Orang-outang Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B de l'Orang-outang)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

R72P: Remplacement de l'arginine en proline au niveau du codon 72

RE: Réticulum endoplasmique

SGHBV: Snow Goose Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B de l'Oie)

sHD: Small Hepatitis Delta protein (Petite protéine du virus de l'hépatite Delta)

SN : Single Nucleotide Polymorphism (Substitutions mononucléotidiques)

TNF: Tumor Necrosis Factors

TP 53: Tumor Protein 53 (Gène codant pour le gène suppresseur de tumeur p53)

UI/L: Unité Internationale par litre

UV: Ultra Violet

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VHB: Virus de l'hépatite B

VHC: Virus de l'hépatite C

VHD: Virus de l'hépatite Delta

VHE: Virus de l'hépatite E

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

WHBV: Woodchuck Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B de la marmotte)

WMHBV: Woolly Monkey Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B du singe laineux)

γ GT: Gamma Glutamyl Transférase

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1: Anatomie du foie humain (Abdel-Misih and Bloomston 2010) | 4 |
| Figure 2: Architecture du parenchyme hépatique (Bhatia <i>et al.</i> 2014) | 6 |
| Figure 3: Epidémiologie globale du carcinome hépatocellulaire (El-Serag, 2012)..... | 9 |
| Figure 4: Phylogénie de Hepadnaviridae (Suh <i>et al.</i> 2014) | 11 |
| Figure 5: Structure du virus de l'hépatite B (Urban <i>et al.</i> 2010) | 11 |
| Figure 6: Structure et organisation du génome du VHB chez les mammifères (Gerlich 2013) | 12 |
| Figure 7: Cycle de réplication du virus de l'hépatite B (Liang 2009) | 15 |
| Figure 8: Répartition de la prévalence et des génotypes du virus de l'hépatite B dans le monde (Gerlich 2013)..... | 18 |
| Figure 9: Organisation génomique du VHC (Selimovic <i>et al.</i> 2012) | 27 |
| Figure 10: Cycle réplicatif du HCV (Moradpour <i>et al.</i> 2007; Bartenschlager <i>et al.</i> 2010)..... | 33 |
| Figure 11: Prévalence du VHC et répartition des différents génotypes dans le monde (Messina <i>et al.</i> 2015)..... | 35 |
| Figure 12: Particule virale du virus de l'hépatite Delta (Giersch and Dandri 2015)..... | 42 |
| Figure 13: Représentation du génome de l'hépatite Delta (Makino <i>et al.</i> 1987) | 43 |
| Figure 14: Le cycle de réplication de l'hépatite delta adapté suivant (Abbas and Afzal 2013) | 45 |
| Figure 15: Répartition globale des génotypes du virus de l'hépatite Delta en rouge (Hughes <i>et al.</i> 2011). | 46 |
| Figure 16: Représentation schématique de l'organisation génomique du virus de l'hépatite E (Ahmad <i>et al.</i> , 2011) (Mushahwar 2008)..... | 51 |
| Figure 17: Cycle de réplication du VHE (Ahmad <i>et al.</i> 2011)..... | 52 |
| Figure 18: Les voies de transmission du VHE (Kamar <i>et al.</i> , 2012) | 53 |
| Figure 19: Cinétique d'évolution des marqueurs au cours de l'infection par le VHE (Kamar <i>et al.</i> 2014; Krain <i>et al.</i> 2014). | 55 |
| Figure 20: Structure de la protéine p53 (Batinac <i>et al.</i> 2003)..... | 58 |
| Figure 21: ADN mitochondrial humain (Taanman 1999). | 61 |
| Figure 22: Représentation schématique du génome d'AAV (Janovitz <i>et al.</i> 2014)..... | 62 |
| Figure 23: Progression histopathologique du foie vers le CHC. Tiré de (Farazi et DePinho 2006). | 63 |
| Figure 24: Hépatocarcinogénèse du carcinome hépatocellulaire (Aravalli <i>et al.</i> 2008) | 64 |
| Figure 25: Les taux d'ALT et d'ASAT chez les patients cancers avec et sans hépatite E | 108 |
| Figure 26: Arbre phylogénétique du VHB des cas et des témoins basé sur le gène S. | 113 |
| Figure 27: Arbre phylogénétique du VHC des cas et des témoins basé sur le gène capsid. | 114 |
| Figure 28: Arbre phylogénétique du VHC des cas et des témoins basé sur le gène NS5B..... | 115 |
| Figure 29: Séquences des acides aminés du gène capsid du VHC des cas et des témoins | 116 |
| Figure 30: Séquences des acides aminés du gène capsid du VHC des cas et des témoins | 117 |
| Figure 31: Fréquence des mutations nucléotidiques du gène capsid du virus de l'hépatite C chez les cas et les témoins. | 118 |
| Figure 32: Séquences des acides aminés du gène NS5B du VHC des cas et des témoins..... | 119 |
| Figure 33: Séquences des acides aminés du gène NS5B du VHC des cas et des témoins..... | 120 |
| Figure 34: Fréquence des mutations nucléotidiques du gène NS5B du virus de l'hépatite C chez les cas et les témoins. | 121 |
| Figure 35: Fréquence des mutations nucléotidiques du gène Précore/C/BCP du virus de l'hépatite B chez les cas et les témoins. | 122 |

| | |
|---|-----|
| Figure 36:Fréquence de détection des mutations nucléotidiques du gène Pré-S du virus de l'hépatite B chez les cas et les témoins. | 123 |
| Figure 37:Séquences en acide aminées du gène précore/Core du VHB des cas et des témoins..... | 123 |
| Figure 38:Fréquence de détection des mutations nucléotidiques du gène Précore/core du virus de l'hépatite B chez les cas et les témoins. | 124 |
| Figure 39:Photo du gel permettant d'identifier la qualité des ADN par PCR bêta-globine. | 124 |
| Figure 40:Les taux d'ADN mitochondriaux chez les cas, les témoins 1 et les témoins 2. | 125 |
| Figure 41:Représentation des différents haplogroupes mitochondriaux chez les cas, les témoins 1 et les témoins 2. | 125 |
| Figure 42:Fréquences de détection des différents génotypes SNP du codon 72 chez les cas, les témoins 1 et les témoins 2. | 126 |
| Figure 43:Fréquences de la mutation R249S chez les cas et les témoins. | 127 |
| Figure 44:Fréquences de la mutation R249S chez les cas et les témoins. | 127 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1: Classification des sérotypes du virus de l'hépatite B (Norder <i>et al.</i> 1992)..... | 17 |
| Tableau 2: Caractéristiques des amorces utilisées lors de l'analyse mutationnelle VHB | 93 |
| Tableau 3: Les caractéristiques socio-démographiques des patients..... | 102 |
| Tableau 4: Régions et ethnies des patients cancers inclus | 104 |
| Tableau 5: Les caractéristiques démographiques des cas et des témoins inclus. | 105 |
| Tableau 6: Prévalence de l'hépatite B, C, D et risque associé au carcinoma hépatocellulaire chez les cas et les témoins. | 107 |
| Tableau 7: Séroprévalence des marqueurs sérologiques de l'infection par le virus de l'hépatite E et caractéristiques socio-démographiques des patients..... | 109 |
| Tableau 8: Distribution de la charge virale VHB et VHC chez les cas et témoins 1 | 110 |
| Tableau 9: Identification du risque associé à l'augmentation de la CV hépatite B sur le développement du carcinoma hépatocellulaire..... | 111 |
| Tableau 10: Identification du risque associé à l'augmentation de la CV hépatite C sur le développement du carcinoma hépatocellulaire. | 112 |
| Tableau 11: Risque associé aux mutations affectant les gènes NS5B, Capside et CHC. | 121 |

RESUME

En Afrique noire et en particulier au Cameroun, les cancers primitifs du foie (CPF) représentent les cancers les plus courants en termes d'incidence et de mortalité. A ce jour, très peu de données sont disponibles sur l'incidence et les facteurs associés à leur développement. Dans ce contexte, nous nous sommes donc fixés pour objectif principal d'étudier l'épidémiologie générale et moléculaire des CPF au Cameroun à partir des études descriptives et prospectives.

L'identification des différents types de CPF a été réalisée à travers une étude descriptive sur une période de dix ans (2004 -2013) qui s'est tenu au Service d'Anatomie et Pathologie du Centre Pasteur du Cameroun. L'identification des facteurs virologiques et des altérations génétiques circulants des cancers primitifs du foie a été faite à travers une étude prospective du type cas-témoin. Nous avons cherché à caractériser les facteurs virologiques des CPF par identification tour à tour des agents virologiques, les niveaux de réplifications, les types de virus et de mutations sur certains gènes. Pour ce qui est des altérations génétiques circulantes, elles ont été recherchées par identification des mutations ponctuelles et par recherche des marqueurs de prédisposition. Les analyses statistiques des différentes données générées ont été faites à l'aide des logiciels SPSS 16.0 et Prism 6.0.

Au terme des analyses effectuées, il ressort que le carcinome hépatocellulaire identifié dans 98,8% des cas et l'hépatoblastome (1,2%) sont les seuls types de CPF répertoriés. Etant donné que l'étiologie des CPF varie d'un pays à un autre, la partie prospective de ce travail a consisté à la recherche des paramètres virologiques et altérations génétiques associées au développement des CPF au Cameroun. Au terme des différentes analyses effectuées, il ressort qu'au Cameroun, les principaux agents virologiques impliqués dans le développement du principal type de CPF du foie sont le virus de l'hépatite B et celui de l'hépatite C avec les risques de 16 et 10 respectivement. Le risque de développer un CPF en cas d'infection par le virus de l'hépatite B est accentué en cas de coinfection par le virus de l'hépatite Delta avec un risque qui passe à 29. Les paramètres virologiques tels que une charge virale élevée, l'infection par le génotype A de l'hépatite B et 4 de l'hépatite C ainsi que la présence certaines mutations virales accentuerait le développement des CPF. Enfin, les mutations ponctuelles sur l'ADN mitochondriale et sur le gène suppresseur de tumeurs p53 sont les principales altérations génétiques circulant significativement impliquées dans le développement des CPF du foie au Cameroun. Ces deux marqueurs pourraient être utilisées comme outil de diagnostic précoce chez les patients à risque et pallier au problème de forte mortalité associée au diagnostic tardif.

Mots clés: Cancers primitifs du foie, carcinome hépatocellulaire, altérations génétiques, facteurs virologiques, biomarqueurs.

ABSTRACT

Primary liver cancer (PLC) is the most common cause of cancer-related death in sub-Saharan Africa and particularly in Cameroon. To date, little is known on the incidence and etiology of primary liver cancer in this area. The current study was undertaken to identify the different types of primary liver cancer diagnosed in Cameroon and to investigate the virological risk factors and the genetic alterations associated with the development of this malignancy in Cameroon using a retrospective and a case control study.

A retrospective study was undertaken in the Anatomy and pathology of the Centre Pasteur of Cameroon to assess the incidence of the different types of PLC in Cameroon. Subsequently, a case-control study was conducted in the Gastroenterology Unit of Central Hospital of Yaounde in collaboration with the Centre Pasteur of Cameroon. This part of the work was conducted in order to identify the viral etiology and genetics alterations associated with the development of PLC. Viral agents associated with the development of PLC were searched by identification of serological markers and several molecular factors including viral load, genotypes and genetics mutations. In the current study, genetics alterations circulating in the blood of HCC patients and control individuals were assessed by identification of several mutations and polymorphisms.

Overall, only HCC (98.8%) and hepatoblastoma (1.2%) were diagnosed over a period selected. The risk factors analysis showed that hepatitis B, C, D and E viruses were strongly associated with HCC development in Cameroon with odds ratios of 15.98 (95% CI 6.19-41.25), 7.33 (95% CI 2.09-25.77), 29.3 (95% CI, 4.1-1231) and 5.8 (2.3-18) respectively. Furthermore, the risk of developing HCC increased even more significantly in cases of hepatitis B and C co-infections, an increase viral load more than 10 000UI/ml, infection with hepatitis B quasisubgenotype A3 or hepatitis C genotype 4f and several genetics mutations. Regarding genetic alterations, HCC patients displayed lower levels of circulating mitochondrial DNA whereas the *TP53* R249S mutation was found to be significantly ($P < 0.05$) more frequent as compared to controls. The *TP53* R72P polymorphisms distribution and mitochondrials haplogroups were statistically similar in HCC cases and controls.

As a conclusion, HCC was the only PLC diagnosed among adults in Cameroon. Infection with hepatitis B, C, D and E represent the main viral cause of HCC in Cameroonian patients. Mitochondrial DNA and R249S mutation of the p53-encoding gene were the only genetic alterations found statistically different in HCC cases and compared controls. They could be used as biomarkers for early diagnosis and prognosis of HCC.

Keywords: Primary liver cancer, hepatocellular carcinoma, genetics alterations, virologicals factors, biomarkers.

INTRODUCTION GENERALE

Les cancers primitifs du foie (CPF) représentent un véritable problème de santé publique. Globalement, le principal type de CPF est le carcinome hépatocellulaire (CHC). Ce dernier occupe le 5^e rang en terme d'incidence; c'est la 2^e cause de mortalité par cancer dans le globe après le cancer du poumon avec plus de 700 000 cas enregistrés en 2012 (Ferlay *et al.*, 2015). En Afrique noire et en particulier au Cameroun, le pronostic du CHC est très sombre car dans cette région, le nombre de cas incidents correspond exactement au nombre de décès. Au Cameroun, l'étude réalisée il a plus de 20 ans avait montré qu'il était le premier cancer incident chez les hommes et le deuxième chez les femmes mais la première cause de décès par cancers (Mbakop, Yomi, Yankeum, Nkegoum et Mouelle Sone, 1997). Forte mortalité due à un diagnostic tardif et à l'inefficacité voire à l'absence des traitements proposés pour les stades avancés. En absence de traitement, la survie ne dépasse guère les 5 à 8 mois (Kew, 2013).

Les CPF sont des tumeurs malignes avec une évolution longtemps asymptomatique dans 70-80% des cas, ils se développent dans des foies cirrhotiques. On note donc principalement lors des stades avancés chez les patients la présence d'un ventre ballonné signe de la présence du liquide d'ascite dans l'abdomen. Le diagnostic des CPF fait intervenir des techniques d'imageries médicales à l'instar de l'échographie abdominale, cette technique est très peu sensible. A cet effet, le diagnostic est souvent complété par le dosage du taux d'alpha foetoprotéine (AFP) sérique. Dans de rares cas, les techniques invasives de confirmation telle que la biopsie et la cytoponction hépatiques peuvent également être utilisées (Attwa and El-Etreby, 2015).

Les CPF résultent à la fois de la combinaison des carcinogènes ou facteurs de risque exogènes et endogènes. Comme tout cancer, ils se caractérisent par une multiplication anarchique et incontrôlée aux dépens des cellules du foie. La répartition géographique des facteurs associés à son développement peut varier d'une région à une autre mais globalement, les facteurs viraux sont les principaux facteurs étiologiques responsables de son développement (El-Serag, 2012).

Diverses études ont montré une forte implication des paramètres virologiques tels que le taux de réplication ou la charge virale, (Chu, Hussain et Lok, 2002a; Mendy *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012) certaines mutations et génotypes des hépatites virales B et C sur le développement des CPF (Chan *et al.*, 2004; Sarma *et al.*, 2012; Sunbul, 2014; H.-I. Yang *et*

al., 2008). La coinfection hépatite B et hépatite Delta a également été suspectée comme capable d'accentuer la progression vers la chronicité et le cancer (Abbas, Abbas, Abbas et Shazi, 2015). De même, la détection des cas d'hépatites E chroniques chez les patients immunodéprimés a donc classé l'hépatite E comme probable agent viral impliqué dans le développement des cancers du foie (Atiq *et al.*, 2009a; Hamid *et al.*, 2002; Hoan *et al.*, 2015; Ramachandran *et al.*, 2004). D'autres facteurs tels que une consommation abusive d'alcool, une consommation des aliments intoxiqués par les mycotoxines Aflatoxine B1 sont des carcinogènes non viraux impliqués dans le développement des CPF (Forner, Llovet et Bruix, 2012; J. Gao *et al.*, 2012).

Toutefois, parmi les patients diagnostiqués, une minorité peut ni présenter une sérologie hépatite B et/ou C positive ou ni consommer d'alcool, ni résider dans les pays où les aliments sont intoxiqués par les mycotoxines. Ceci suggère donc l'implication des facteurs non environnementaux sur le développement des CPF (Gao *et al.*, 2012).

Au cours du développement des CPF, diverses altérations peuvent être observées. Ces altérations peuvent être de type qualitatif et/ou quantitatif. Les différentes altérations génétiques peuvent être de susceptibilité ethnoculturelle et individuelle. On peut également notifié certaines mutations ponctuelle sur certains gènes et certaines anomalies chromosomique chez certains patients (Pineau *et al.*, 2008).

L'Afrique noire est une région de très haute endémicité pour les virus des hépatites B (VHB), C (VHC) et D (VHD) les principaux agents fortement impliqués dans le développement des CPF dans le globe (Kew, 2010; Kramvis et Kew, 2007). A ce jour, peu de données sont disponibles sur les CPF en Afrique noire. Au Cameroun, les quelques études descriptives réalisées ont porté essentiellement sur les aspects épidémiologique, clinique et diagnostique des CPF. A notre connaissance, aucune étude de type cas témoins permettant d'identifié les facteurs viraux et les altérations génétiques associées à son développement n'a pas encore été menée en Afrique Centrale et en particulier au Cameroun (Mbakop *et al.*, 1997; Ndjitoyap Ndam *et al.*, 1991; Njoya *et al.*, 2000). De même, les différents types de cancers primitifs diagnostiqués demeurent méconnus au Cameroun.

Nous nous sommes dit qu'une identification des différents CPF, des facteurs virologiques et des altérations génétiques associées au développement des CPF pourraient contribuer à la bonne maîtrise l'épidémiologie des CPF ainsi qu'à la définition de biomarqueurs et indicateurs non invasifs pouvant améliorer le pronostic de ces tumeurs au Cameroun.

Nous nous sommes donc posé les questions de recherche ci-après suivantes:

Questions de recherche

1-Quels sont les différents types de cancers primitifs du foie diagnostiqués au Cameroun?

2-Quels sont les facteurs virologiques associés au développement des cancers primitifs du foie au Cameroun?

3-Quelles sont les altérations génétiques associées qui en découlent?

Hypothèses de recherche

1-Différents types de cancers primitifs du foie pourraient être diagnostiqués au Cameroun.

2-Toutes les hépatites virales réputées de chronicité pourraient induire des cancers primitifs du foie.

3-L'identification de certaines altérations génétiques pourrait engendrer des bio-marqueurs pour le diagnostic précoce.

Objectifs de l'étude:

Objectif général

L'objectif général de cette étude était d'étudier l'épidémiologie et les altérations génétiques circulantes des cancers primitifs du foie au Cameroun.

Plus spécifiquement il s'est agit de:

Objectifs Spécifiques

- Décrire les différents types de cancers primitifs du foie au Cameroun;
- Déterminer les facteurs virologiques associés au développement des cancers primitifs du foie au Cameroun;
- Rechercher les altérations génétiques circulant associées à leur développement.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

I.1 Généralités sur le foie humain

I.1.1 Anatomie et histologie

Sur le plan anatomique, le foie humain est logé dans l'abdomen sous la coupole diaphragmatique droite (Figure 1). C'est un organe qui a une forme triangulaire et une face supérieure convexe qui suit les contours du diaphragme. Sa face inférieure est parcourue par trois sillons dont l'un d'eux est le hile du foie où convergent les vaisseaux sanguins qui arrivent au foie. Le foie est l'organe interne le plus volumineux chez l'homme; son poids est d'environ 1,5 kg chez les personnes adultes (Abdel-Misih et Bloomston, 2010; Crossingham *et al.*, 2009). C'est un gros organe par la taille : 26 cm en moyenne dans sa plus grande dimension.

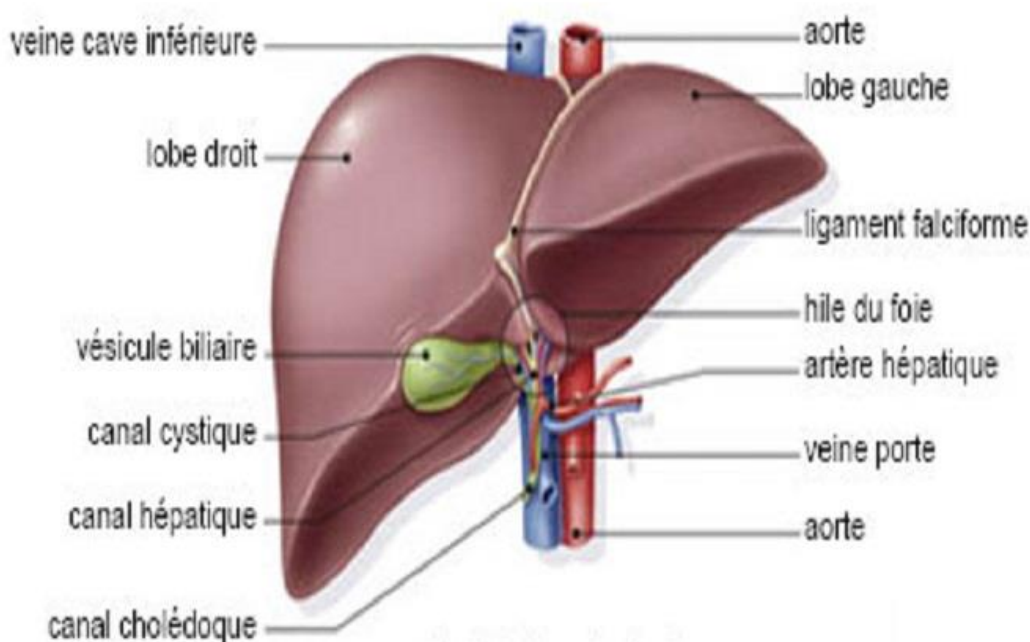


Figure 1: Anatomie du foie humain (Abdel-Misih and Bloomston 2010)

Sur le plan histologique, le foie est constitué d'unités fonctionnelles appelées lobules hépatiques ainsi que diverses unités microscopiques séparées entre eux par des espaces portes et des espaces conjonctifs portes. Les lobules hépatiques sont organisés autour d'une veine centrale; ils sont séparés entre eux par des espaces portes contenant des canaux biliaires, des petites branches de la veine porte et de l'artère hépatique. Les lobules sont constitués de travées cellulaires de 20 à 25 hépatocytes, reliées entre elles en délimitant des lacunes hépatiques à l'intérieur desquelles cheminent les sinusoides hépatiques. Chaque lacune est

ainsi divisée en une sinusoïde et un espace de « Disse » qui sert de lieu d'échanges de substances entre le sérum et les hépatocytes (Abdel-Misih et Bloomston, 2010; Taub, 2004).

Le flux sanguin hépatique est fait de façon unidirectionnelle de la veine porte aux veines hépatiques. La lymphe, par contre, se forme par filtration du plasma vers les espaces de Disse lorsque le sang passe par les sinusoïdes. L'innervation du foie se fait surtout par le système sympathique à travers des fibres nerveuses adrénériques tandis que le système parasympathique fait intervenir les fibres nerveuses cholinergiques (Abdel-Misih et Bloomston, 2010; Crossingham *et al.*, 2009).

I.1.2 Les différents types cellulaires et fonctions hépatiques

Les différents types de cellules hépatiques sont très organisés d'un point de vue architectural et coopèrent entre elles pour assurer les diverses fonctions métaboliques et excrétrices du foie. Les types de cellulaires présents dans le foie sont définis comme parenchymateux et non parenchymateux (**Figure 2**) (Bhatia, Underhill, Zaret et Fox, 2014).

Les cellules parenchymateuses sont les hépatocytes et les cholangiocytes. Ces deux types cellulaires constituent ce que l'on appelle le « parenchyme hépatique » (un parenchyme est un tissu remplissant des fonctions précises par opposition aux tissus de soutien). Les cellules parenchymateuses dont les hépatocytes sont de loin le type cellulaire le plus abondant et représentent le site majeur du métabolisme des xénobiotiques et substances endogènes.

Les cellules parenchymateuses sont responsables de la plupart des fonctions assurées par le foie telles que la production de bile, la détoxification des substances toxiques pour l'organisme, ou encore la régulation du métabolisme des lipides, des glucides et des acides aminés. Outre les cellules parenchymateuses, le foie est également constitué de cellules non parenchymateuses comme les cellules de Küppfer (macrophagiques), les cellules endothéliales, les cellules étoilées, assurant plus spécifiquement des fonctions immunitaires et de vascularisation ou impliquées dans la fibrose hépatique (Bhatia *et al.*, 2014).

I.2 Généralités sur les cancers

Le terme cancer s'applique à un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme. Le cancer est un processus complexe se caractérisant par la présence de cellules dont la prolifération est anormale, incontrôlée pouvant envahir des parties adjacentes de l'organisme puis essaimer dans d'autres organes. C'est un processus évolutif capable de se propager dans l'organisme. Le cancer peut atteindre de nombreux sites chez un

individu et se présenter sous différentes formes (Anwar, Khaled, Amra, El-Nezami et Loffredo, 2008; Farazi et DePinho, 2006; Forner *et al.*, 2012).

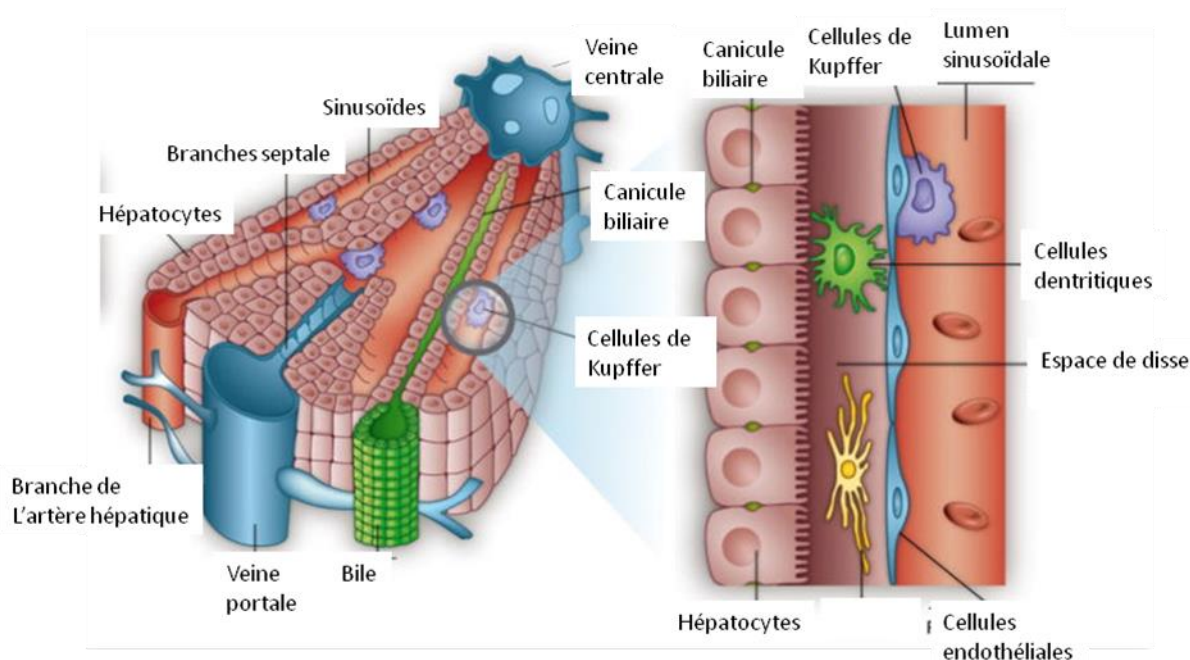


Figure 2: Architecture du parenchyme hépatique (Bhatia *et al.* 2014)

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde ; en 2012, il a été à l'origine de près de 8,2 millions de cas de décès (Ferlay *et al.*, 2015). A l'échelle mondiale, les cinq cancers qui ont été les plus fréquemment diagnostiqués en 2012 sont les suivants: le cancer du poumon classé comme la première cause de décès par cancer avec plus de 1,59 millions de décès suivi en deuxième position par le cancer du foie (745 000 décès), le cancer de l'estomac (723 000), le cancer colorectal (694 000) et le cancer du sein (521 000) (Ferlay *et al.*, 2015).

Les nombreuses études menées jusqu'à présent sur différents cancers montrent que la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse est un processus qui passe par plusieurs étapes. Ces étapes correspondent à des diverses altérations génétiques et/ou épigénétiques impliquant de nombreux sites et provoquant ainsi la dérégulation des voies de régulation des fonctions cellulaires, notamment la fonction proliférative (Farazi et DePinho, 2006).

Il existe deux grands types de cancers à savoir les cancers primitifs encore appelés cancers primaires qui sont des cancers qui se développent à travers des cellules de l'organe où on les trouve par opposition aux cancers secondaires ou cancers métastatiques qui sont des cancers ayant pris naissance dans d'autres organes que l'organe affecté. En d'autres termes, les cancers métastatiques sont ceux qui atteignent l'organe cible étudié via la circulation

sanguine et/ou lymphatique; ce type de cancer débute généralement dans les organes voisins de l'organe cible atteint (Chambers, Groom et MacDonald, 2002; Sethi et Kang, 2011).

I.2.1 Définition et différents types de cancers du foie

Le cancer primitif du foie désigne une tumeur maligne qui se développe à partir des cellules hépatiques. Le foie peut également être atteint par des métastases c'est-à-dire des tumeurs formées de cellules cancéreuses qui se sont détachées d'une tumeur primitive située ailleurs dans l'organisme par exemple dans le côlon ou le sein. Ce deuxième type porte le nom de cancer secondaire du foie (Ferazi and Depinho, 2006).

I.2.2 Différents types de cancers primaires du foie

Chaque type de cancer primitif du foie se définit par le type de cellules responsable de la prolifération. Le foie est majoritairement constitué d'hépatocytes ce qui fait du carcinome hépatocellulaire ou hépatocarcinome le type de cancer primitif le plus fréquent. Le carcinome hépatocellulaire ou hépatocarcinome représente plus de 90 % des cancers primitifs du foie diagnostiqués dans le monde (Arzumanyan, Reis et Feitelson, 2013). Après le carcinome hépatocellulaire, le deuxième cancer primitif du foie est le cholangiocarcinome. Ce deuxième type se développe grâce aux cholangiocytes qui sont les canaux qui conduisent la bile depuis le foie jusqu'à la vésicule (Dubaniewicz et Dubaniewicz, 2003; Patel, 2006). Plus rarement, le cancer primitif du foie peut aussi se développer aux dépens de vaisseaux sanguins c'est le cas de l'angiocarcinome (Bismuth *et al.*, 2009); ou via les cellules embryonnaires hépatiques dans ce cas il portera le nom d'hépatoblastome (Devi, Kumar, Handique et Kumar, 2014).

I.3 Le carcinome hépatocellulaire

I.3.1 Epidémiologie descriptive

Les facteurs de risque associés au développement du CHC peuvent être soit intrinsèques soit extrinsèques. Les facteurs de risque extrinsèques peuvent être viraux ou non viraux. Les facteurs de risque viraux correspondent aux infections chroniques par les virus des hépatites virales B, C et D. L'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) est impliquée dans plus de 50% de cas de CHC incidents dans le monde. L'autre facteur viral majeur est l'infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC) impliqué dans près de 25% des cas de CHC (Anwar *et al.*, 2008; Forner *et al.*, 2012).

Le rôle du virus delta est moins bien connu et de façon générale son importance est sous-évaluée notamment en Afrique noire. Parmi les facteurs extrinsèques non viraux on peut citer : la contamination des aliments par les mycotoxines telles que l'Aflatoxine B1 (facteur accroissant le risque de survenue du CHC dans les zones de forte incidence de la tumeur), l'intoxication

chronique par l'alcool, le tabagisme et les troubles métaboliques tels que le diabète non-insulino-dépendant, l'obésité ou le syndrome métabolique (J. Gao *et al.*, 2012). Outre les facteurs précédemment cités, le CHC découle également de caractéristiques intrinsèques aux patients comme certains polymorphismes génétiques qualifiés de facteurs de risque génétiques (Nishida et Goel, 2011).

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) ou hépatocarcinome représente le cinquième cancer le plus fréquent au monde. Son pronostic est généralement très mauvais. Le CHC est beaucoup plus fréquent chez les hommes que chez les femmes. En Afrique noire il se situe au deuxième rang chez l'homme et au troisième rang chez la femme avec un nombre de décès identique au nombre de cas incidents (Kew, 2013). Au Cameroun, c'est le premier cancer en terme d'incidence chez l'homme et le troisième chez la femme. Son pronostic est très sombre; c'est donc la première cause de décès par cancer dans le pays (Mbakop *et al.*, 1997). Cette très forte mortalité est essentiellement due à un diagnostic tardif et à l'inefficacité voire à l'absence des traitements proposés dans les stades avancés.

En fonction de l'importance de l'exposition aux facteurs de risque, l'incidence du carcinome hépatocellulaire varie dans le monde. Trois grandes zones épidémiologiques ont été globalement définies : les régions de faible, de moyenne et de forte prévalence (El-Serag, 2012a; Mittal et El-Serag, 2013) (**Figure 3**).

Les pays les plus touchés sont ceux situés en Asie du Sud-Est et en Afrique subsaharienne. Dans ces pays, le nombre de cas incidents sur 100 000 habitants est supérieur à 15. Dans ces pays, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est fortement endémique. L'infection chronique par le VHB représente le principal facteur de risque associé au développement du CHC. En plus de l'infection par le VHB, d'autres facteurs de risque tels que la contamination des aliments par la mycotoxine Aflatoxine B1 (AFB1) influencent également l'apparition du CHC. En effet, diverses études ont démontré la synergie qui existe entre l'infection par le VHB et l'exposition à l'aflatoxine dans l'oncogénèse hépatique et dans l'hépatocarcinogénèse (El-Serag, 2012 ; Mittal and El-Serag, 2013).

L'incidence du CHC est très faible dans les pays de l'Europe et de l'Amérique du Nord. Dans ces pays, le nombre de cas incidents sur 100 000 habitants est inférieur à 5 (**Figure 3**). Dans ces pays, le taux de porteurs chroniques du VHB est faible. D'autres facteurs comme l'infection par le VHC et la consommation abusive d'alcool par induction de cirrhose sont fortement associés au CHC dans ces pays (Gouas *et al.*, 2012).

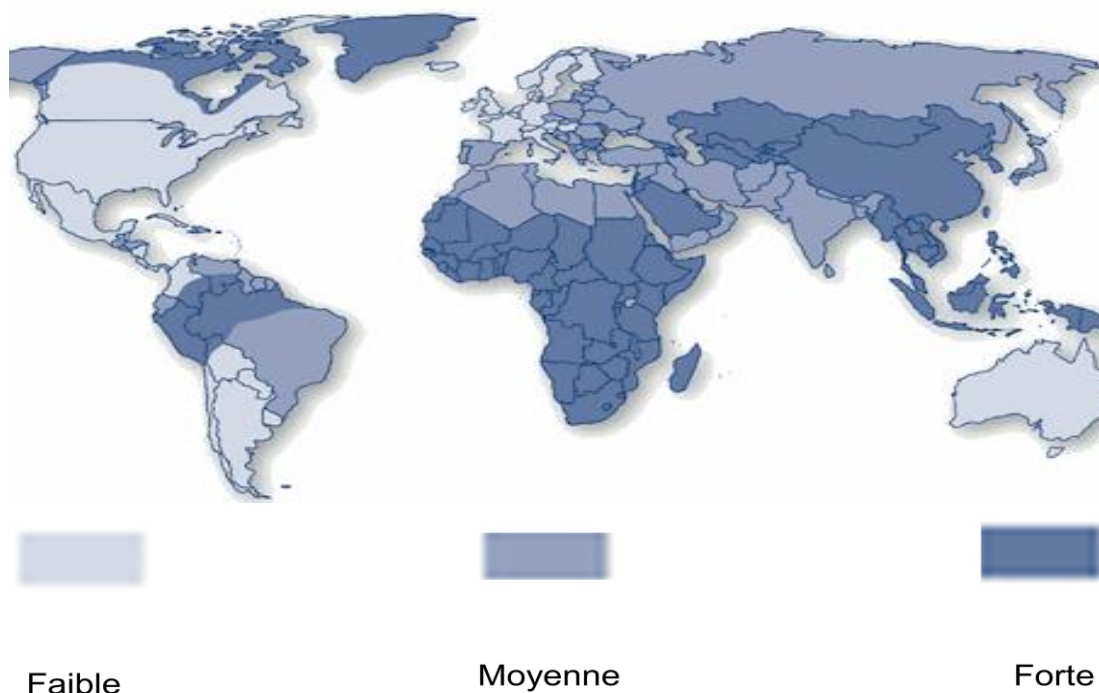


Figure 3: Epidémiologie globale du carcinome hépatocellulaire (El-Serag, 2012).

Lorsque le nombre de cas incidents sur 100 000 habitants est compris entre 5 et 15, la zone est classée d'incidence intermédiaire (**Figure 3**) c'est le cas par exemple des pays d'Afrique du Nord, du moyen Orient, l'Inde et le Japon. Dans ces pays, les infections chroniques par le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC) et d'autres facteurs environnementaux sont des causes de son développement. Compte tenu du climat chaud et humide, l'Inde et/ou les pays de l'Amérique du Sud pourraient être potentiellement contaminé par la mycotoxine Aflatoxine (J. Gao *et al.*, 2012).

Dans la majeure partie des cas, le diagnostic du CHC se fait dans un stade très avancé présentant une très faible survie ou même absente (Bialecki et Di Bisceglie, 2005). A ces stades avancés, les traitements proposés ne sont pas efficaces. Dans les pays en voie de développement ou l'incidence est la plus forte, aucun traitement n'est disponible. Les patients diagnostiqués sont soumis à des soins palliatifs qui permettent d'alléger les souffrances des patients avant leur mort.

I.3.2 Facteurs de risque

Comme tout cancer, le CHC est une maladie qui découle de divers facteurs de risques (J. Gao *et al.*, 2012). Ces derniers peuvent être regroupés en deux grands groupes à savoir les facteurs de risque viraux et les facteurs de risque non viraux.

I.3.2.1 Facteurs de risque viraux

Les facteurs de risque viraux associés au développement du CHC renvoient aux infections chroniques par les virus hépatiques B, C et Delta. Tout récemment, l'hépatite E a été soupçonnée comme un facteur de risque additif pour le développement des cancers primitifs du foie.

I.3.2.1.1 Le virus de l'hépatite B

I.3.2.1.1.1 Historique de la découverte

Le virus de l'hépatite B (VHB) a été découvert en 1963 par Baruch S. Blumberg lorsqu'il a mis en évidence une réaction inhabituelle spécifique entre le sérum d'un aborigène Australien atteint d'hépatite et les séra des patients hémophiles Américains polytransfusés. L'auteur avait cru avoir découvert une nouvelle lipoprotéine dans la population autochtone. Cette lipoprotéine avait été désignée « antigène Australia » connu plus tard sous le nom d'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg). L'antigène de surface a par la suite été associé de façon spécifique à une hépatite post transfusionnelle qualifiée d'hépatite B entre les années 1967 et 1968 (Blumberg, 2002; Gerlich, 2013).

I.3.2.1.1.2 Taxonomie du virus de l'hépatite B

Le VHB est un membre de la famille des *Hepadnaviridae* ou la famille des virus à ADN hépatotropes, qui infecte essentiellement les hépatocytes (Schaefer, 2007). Cette famille comporte deux genres à savoir le genre *Orthohepadnavirus* (infecte les mammifères et les rongeurs) et le genre *Avihepadnavirus* (infecte les oiseaux). Ces deux genres présentent les mêmes caractéristiques sur le plan morphologique, organisation génétique, mode de réplication, et spécificité de l'hôte (**Figure 4**).

I.3.2.1.1.3 Structure du virion

Le virion encore appelé particule de Dane, est un virus enveloppé possédant une capsidie icosaédrique formée d'un seul type de protéine (La protéine C, correspondant à l'antigène HBc). Son génome est constitué d'une molécule d'ADN circulaire, partiellement double brin avec un brin complet de polarité négative (-) et un brin de polarité positive (+) qui ne représente que 50 à 80% du génome (**Figure 5**). L'ADN est associé à la polymérase virale et à une protéine terminale attachée au brin long. La nucléocapsidie est entourée d'une enveloppe lipidique qui dérive du réticulum endoplasmique et qui porte trois glycoprotéines de tailles différentes (L ou *Large*, M ou *Medium* et S ou *Small*) ayant toutes la même spécificité antigénique HBs (Gerlich, 2013; T. J. Liang, 2009).

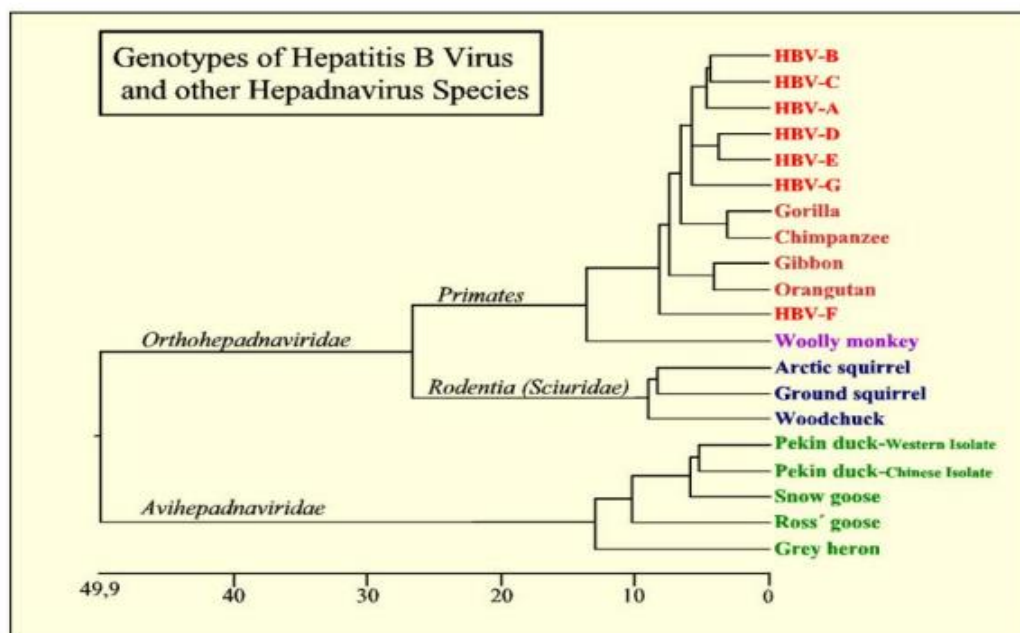


Figure 4: Phylogénie de Hepadnaviridae (Suh *et al.* 2014)

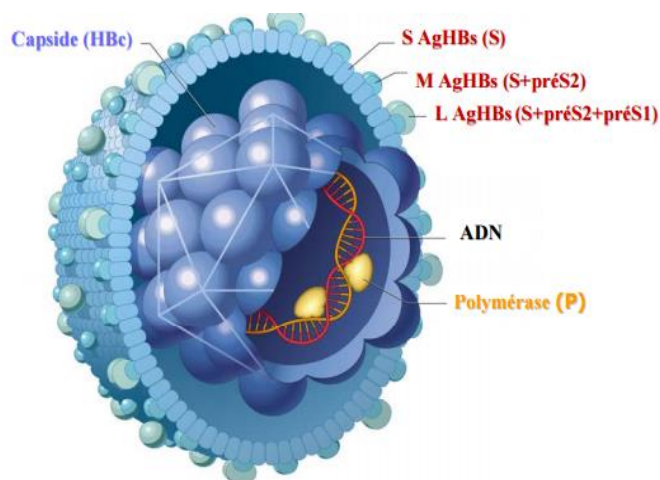


Figure 5: Structure du virus de l'hépatite B (Urban *et al.* 2010)

L'enveloppe est constituée de sous unités protéiques codées par les gènes S, pré-S1 et pré-S2. La capside est formée par l'union de plusieurs sous unités HBc, l'ADN et les enzymes impliquées dans la réplication.

I.3.2.1.1.4 Propriétés physico-chimiques du virus de l'hépatite B

Bien que le virus soit enveloppé, il est relativement résistant. En effet, hors de l'hôte, le VHB peut survivre dans le sang pendant plusieurs semaines. Le VHB est le seul virus enveloppé capable de résister pendant 7 jours à 25°C dans l'environnement (sur les surfaces). L'infectivité d'un sérum contagieux est stable à 37°C pendant 60 minutes et persiste pendant des années à -70°C; cette infectivité est détruite à 100°C juste en quelques minutes. Le VHB

est sensible à l'hypochlorite de sodium à 5%, à l'éthanol à 70%, au glutaraldéhyde à 2%, et au formaldéhyde.

1.3.2.1.1.5 Organisation génomique du virus de l'hépatite B

✓ Les cadres de lecture ouverts

Le génome du VHB est un ADN de petite taille d'environ 3200 pb. Il est extrêmement compact et constitué de quatre cadres de lecture ouverts (ORF : Open Reading Frame) chevauchant dans la même orientation transcriptionnelle et codant neuf protéines (**Figure 6**). 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.

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

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

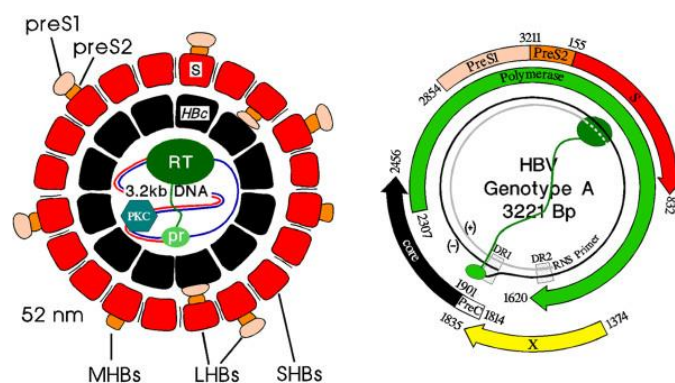


Figure 6: Structure et organisation du génome du VHB chez les mammifères (Gerlich 2013)

ADN circulaire (en noir) partiellement double brin, avec le nucléotide 1 correspondant au site de restriction EcoRI. Il contient quatre promoteurs et des séquences de régulation (signal de polyadénylation, enhancer) qui commandent la synthèse de quatre transcrits codant la capsid virale (C : core, préC : précore), la polymérase (P), l'enveloppe (préS1, préS2, S) et la protéine transactivatrice (X), dont les cadres de lecture sont représentés (Gerlich, 2013)

Le gène P qui fait 80% du génome, code trois peptides avec successivement la protéine terminale une région non codante («spacer ou espaceur»), la polymérase proprement

dite qui a une activité ADN polymérase ARN dépendante et ADN dépendante (transcriptase inverse) et la RNase H.

Le gène X, code une protéine régulatrice HBx, qui du fait de son activité transactivatrice pourrait être impliquée dans la cancérogenèse induite par le VHB. Il n'existe pas de cadre ouvert de lecture correspondant à la région X chez DHBV. Le CHC est directement lié à l'infection par le VHB. Les mécanismes de carcinogenèse qui peuvent expliquer sa survenue chez un patient infecté sont multiples.

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

I.3.2.1.1.6 Structure et fonctions des protéines virales

Les protéines virales du VHB sont dotées de multiples fonctions et propriétés. Certaines protéines sont indispensables à la production des particules virales tandis que d'autres semblent jouer un rôle primordial dans la pathogénie.

La protéine de la capsid et la protéine Précore

Dans le cadre de lecture ouverte C, deux codons initiateurs en phase servent à la traduction de la protéine de capsid (Protéine core ou AgHBc) et d'une protéine soluble (protéine précore ou protéine E ou AgHBe). Elle est constituée, dans sa région N-terminale, d'un domaine important pour l'auto-assemblage et, à l'extrémité C-terminale, d'un domaine riche en arginines indispensable pour l'encapsidation de l'ARN.

La protéine précore (212 aa ; 25 kDa) est le précurseur de l'AgHBc. Elle est synthétisée à partir du premier codon ATG du cadre de lecture C. Elle diffère de la protéine de capsid par la présence d'une région N-terminale de 29 aa. Cette région est hydrophobe et forme un peptide signal qui dirige la protéine naissante vers le RE.

Les protéines de surface (ou d'enveloppe)

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

La Polymérase ou le gène P

C'est un polypeptide qui correspond à 80% du génome; la polymérase virale est constituée de 832 à 845 aa selon le génotype. Son poids moléculaire est de 92 kDa. Le gène P est composé de quatre domaines fonctionnels correspondant de 5' en 3' respectivement à : -La protéine terminale (Terminal protein) qui se lie à l'extrémité 5' du brin (-) de l'ADN dans la particule virale et sert également d'amorce à l'initiation de sa synthèse (primase).

La Protéine X

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

I.3.2.1.1.7 Le cycle de multiplication du virus de l'hépatite B

Le VHB a un tropisme essentiellement hépatocytaire et les formes répliquatives sont donc retrouvées dans ce type de cellules. Cependant, le virus peut également se multiplier dans les cellules de la lignée sanguine (Hassan *et al.*, 2008; Hohenberger, 1985; Pontisso, Poon, Tiollais et Brechot, 1984; Solves, Mirabet *et alvarez*, 2014).

Le cycle répliquatif du VHB se déroule en diverses étapes (**Figure 7**). Ces étapes sont: la fixation aux récepteurs, la synthèse des protéines virales, la réplication du génome viral et l'assemblage puis la sortie des virions (Beck et Nassal, 2007; T. J. Liang, 2009).

Le récepteur du VHB a été découvert récemment il s'agit d'un co-transporteur d'ions sodium/taurocholate codé par le gène SLC10A1 également connu comme protéine NTCP. Cette protéine est un transporteur transmembranaire normalement impliquée dans le transport des acides biliaires exprimés dans le foie (Yan *et al.*, 2012).

La fusion : la pénétration de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de l'hépatocyte fait intervenir un phénomène de fusion. Celle-ci pourrait être liée à un motif de fusion ou « peptide fusion like » composé d'une série d'acides aminés hydrophobes appartenant à la protéine S (Beck et Nassal, 2007; Gerlich, 2013; T. J. Liang, 2009).

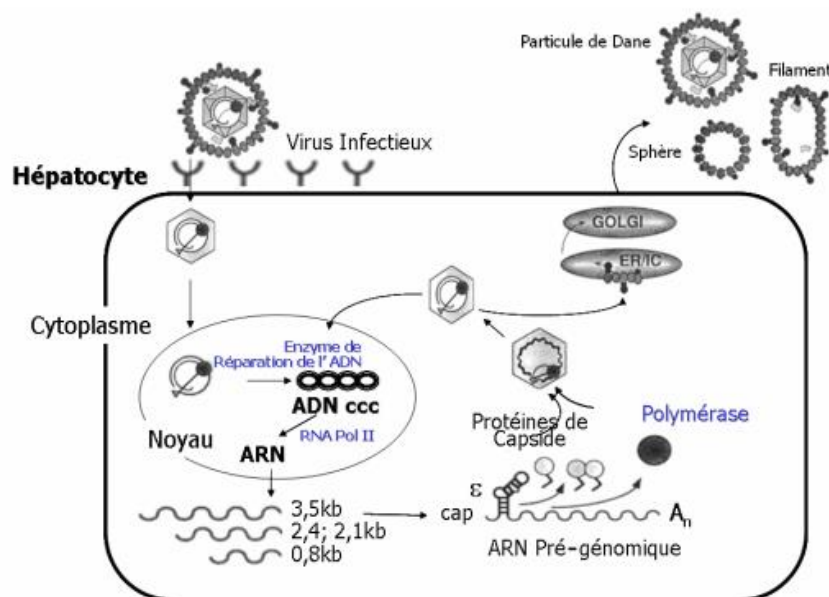


Figure 7: Le cycle de réplication du virus de l'hépatite B (Liang 2009)

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

Migration vers le noyau et décapsidation : Lors de son entrée dans la cellule, le virus perd son enveloppe. La nucléocapside migre vers le noyau de l'hépatocyte et doit être désassemblée pour y libérer son ADN.

Synthèse des ARNm : Les différents ARN viraux sont produits par l'ARN polymérase II de l'hôte. Quatre transcrits différents ont été identifiés : trois ARN messagers (ARNm) et un ARN pré-génomique (pg) tous non épissés. Leur transcription commence à des sites différents mais ils possèdent tous le même site de terminaison en amont d'un signal de polyadénylation (TATAAA) à l'extrémité 3' (Beck et Nassal, 2007; T. J. Liang, 2009).

Reconstitution de la particule virale et réplication du génome viral: L'assemblage de la nucléocapside s'effectue dans le cytoplasme et implique des interactions fines entre les protéines de capsidation, la polymérase et l'ARNpg qui est encapsidé car il est le seul à posséder le signal d'encapsidation structuré en tige-boucle.

Bourgeonnement et sécrétion des particules virales: Le bourgeonnement des particules virales autour de la nucléocapside s'effectue dans un compartiment pré-golgien, le réticulum endoplasmique (RE), correspondant au site de maturation des trois protéines d'enveloppe L, M et S.

I.3.2.1.1.8 La variabilité génétique du virus de l'hépatite B

Malgré un génome de petite taille (3200 pb) et un chevauchement des cadres de lecture, le génome du VHB présente des variations de séquences importantes. La polymérase virale (mais aussi l'ARN polymérase cellulaire) est une enzyme qui ne possède pas d'activité exonucléasique 3' et qui ne corrige donc pas les erreurs de lecture. Il existe au moins une mutation tous les 10^4 à 10^5 nucléotides (Gerlich, 2013; Kao, 2011; Pourkarim, Amini-Bavil-Olyae, Kurbanov, Van Ranst et Tacke, 2014).

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

Les études de séquences d'ADN viral permettent en principe d'étudier l'évolution du génome chez les patients et ainsi de corréler les modifications de séquence de l'ADN viral à des événements cliniques.

-Mutations du gène préS/S :

Les Sérotypes: L'antigène HBs présente un déterminant « a » commun à toutes les souches du VHB. Ce déterminant qui appartient à la protéine S est une épitope conformationnelle. L'antigène HBs existe sous deux formes i/t correspondant respectivement aux acides aminés I/T en position 126. Le déterminant « a » est associé à deux autres déterminants sous deux formes mutuellement exclusives d/y et w/r dont les positions déterminent les sous-types d'AgHBs (Bhatnagar *et al.*, 1982; Manivel, Panda et Rao, 1992). La substitution d'une lysine en une arginine convertit « d » en « y » en position 122 et « w » en « r » en position 160 (d). Quatre sous-types principaux sont possibles : ayr, ayw, adr, adw

(**Tableau 1**). Les sous-types peuvent être associés mais, ils n'ont pas de signification claire. Ces sérotypes, stables, sont définis par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ils ne sont pas liés à une propriété biologique particulière de ces souches et leur étude n'a qu'un intérêt épidémiologique (Norder, Couroucé et Magnius, 1992).

Tableau 1:Classification des sérotypes du virus de l'hépatite B (Norder *et al.* 1992).

| Sérotypes | Les positions des acides aminés caractéristiques sur la séquence AgHBs |
|---------------|--|
| <i>ayw1</i> | 122R + 160K + 127P + (134F et/ou 159 A) |
| <i>ayw2</i> | 122R + 160K +127P |
| <i>ayw3</i> | 122R + 160K+ 127T |
| <i>ayw4</i> | 122R + 160K + 127L |
| <i>Ayr</i> | 122R + 160R |
| <i>Ayr</i> | 122R + 160R +127P |
| <i>adw2</i> | 122K + 160K + 127T |
| <i>adw3</i> | 122K + 160K +127L +178Q |
| <i>adw4q-</i> | 122K + 160R + 177V + 178P |
| <i>Adrq</i> | 122K + 160R + 177V + 178P |
| <i>adrq-</i> | 122K + 160R + 177A |

R: arginine, K: lysine, P: proline, F: phénylalanine, A: alanine, T: thréonime, V: valine, L: leucine et Q: glutamine.

Les Génotypes: La population du VHB humaine est classée en génotypes. Ceux ci sont définis comme possédant entre eux au moins 8% de divergence de la séquence nucléotidique complète (Norder *et al.*, 1992). Ils sont déterminés à partir de la région Prés2 dans la plupart des cas. Actuellement 10 génotypes sont identifiés, représentés de A à I (**Figure 8**) (Kao, 2011; Pourkarim *et al.*, 2014). Le génotype A est ubiquitaire mais prédomine en Europe du Nord-ouest, en Amérique du Nord et en Afrique Centrale. Les génotypes B et C sont limités à l'Asie (Indonésie, Chine, Japon, Corée, Vietnam). Le génotype D est fréquent sur le pourtour du bassin méditerranéen et au Moyen-Orient. L'Afrique de l'ouest est le foyer principal du génotype E. Le génotype F est prédominant en Amérique Latine et Centrale et en Polynésie (P. Arauz-Ruiz, Norder, Visoná et Magnius, 1997). Le génotype G a été identifié aux Etats-Unis et en France (Stuyver *et al.*, 2000). C'est le seul génotype qui semble ne pas être associé à un foyer principal. Le génotype H a été

décrit chez les Amérindiens en Amérique centrale et aux USA (Patricia Arauz-Ruiz, Norder, Robertson et Magnus, 2002).

-Mutants antigène HBs ou mutants d'échappement à la vaccination

Le segment S est le plus important puisqu'il porte un épitope majeur pour la protection contre l'infection. L'utilisation de la vaccination dans les pays à forte prévalence d'hépatite B s'est accompagnée de l'émergence de souches portant des mutations sur le gène S (Purdy, 2007). Plusieurs mutations dans la région correspondant au déterminant « a » ont été décrites dont la plupart sont uniques. La variation la plus fréquente est le remplacement de la glycine (G) en position 145 par une arginine (R) ce qui abolit la spécificité antigénique de la protéine S (Fujii *et al.*, 1992).

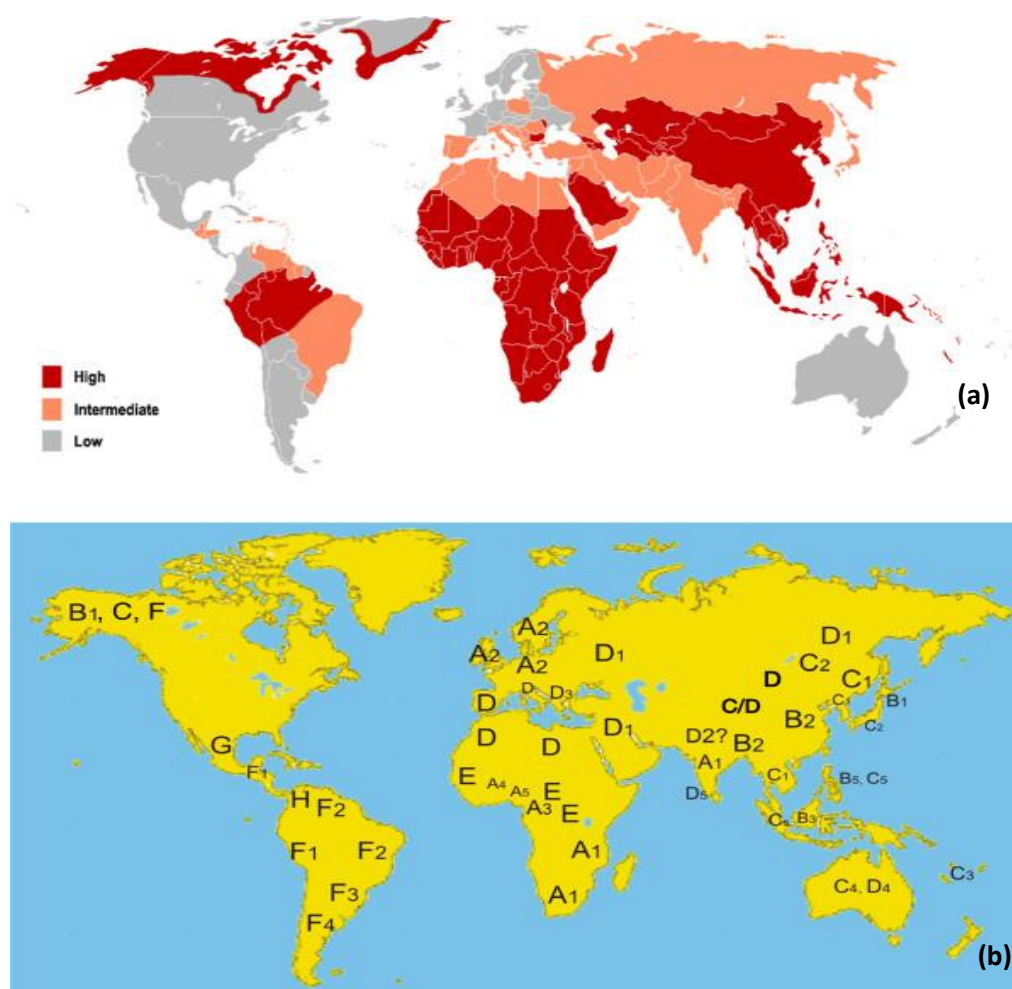


Figure 8: Répartition de la prévalence (a) et des génotypes (b) du virus de l'hépatite B dans le monde (Gerlich 2013).

Le déterminant antigénique majeur n'est plus reconnu par les anticorps dirigés contre l'AgHBs vaccinal. Ces variants, peu fréquents, posent le problème de la formulation future

des vaccins avec incorporation éventuelle des protéines mutées en position 145 (Carman *et al.*, 1990). La modification du déterminant antigénique entraîne aussi l'absence de détection de l'AgHBs et les tests diagnostiques sont alors pris en défaut. Les souches portant cette mutation coexistent souvent avec les souches sauvages chez la mère infectée et peuvent être transmises à l'enfant (Yamamoto *et al.*, 1994).

-Mutations du gène préC/C et les hépatites sans AgHBe

Au cours de l'évolution de l'hépatite chronique active, la protéine E cesse d'être produite et cette disparition de l'antigène HBe s'accompagne de l'apparition d'anticorps anti-HBe. C'est la séroconversion « e » qui se traduit souvent par une diminution importante de la réplication et le virus peut devenir indétectable dans le sérum. Dans la région préC une mutation entraînant le remplacement de la Glycine (G) en position 1896 par une Alanine (A) se traduit par l'apparition d'un codon stop (UAG) à la fin de preC. La synthèse d'une protéine tronquée se traduit par l'arrêt de production de l'AgHBe mais, la synthèse de la protéine C (AgHBc) n'est pas altérée et l'ADN viral reste détectable dans le sérum (Naoumov *et al.*, 1992; Papatheodoridis et Hadziyannis, 2001).

-Mutations du gène P et la résistance au traitement

Le gène de la polymérase du fait de sa longueur est soumis à des variations importantes et souvent une mutation retentit à la fois sur la polymérase et sur les gènes chevauchants. Cependant, la perte de fonction de ce gène n'est pas envisageable puisqu'il est nécessaire à la réplication virale. Une mutation au site actif peut entraîner une résistance à un antiviral tout en conservant la capacité répliquative. (Fischer, Gutfreund et Tyrrell, 2001; K. Liu, Hou, Zumbika et Ni, 2005).

-Mutations du gène X et le carcinome hépatocellulaire

La protéine X est très étudiée afin de tenter de déterminer son rôle éventuel dans la survenue du CHC. Les études de mutations ponctuelles ont montré que la protéine X interagit avec plusieurs systèmes de signalisation intracellulaire et possède un rôle anti-apoptotique. Mais les séquences de la protéine naturelle varient considérablement d'un individu à l'autre et la protéine sauvage peut être présente au cours d'un CHC. La comparaison des séquences de virus circulant chez des patients ayant un CHC ou une hépatite chronique montre une accumulation de mutations en cas de CHC (T. Liang, Chen et Tang, 2013). Mais cette observation est peut être simplement le fait d'une plus longue évolution de la maladie.

I.3.2.1.1.9 Epidémiologie du virus de l'hépatite B

Répartition mondiale

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

– Les zones de forte endémie avec (une prévalence >8%), ces zones regroupent l'Afrique sub-saharienne, l'Asie du Sud-Est et le bassin amazonien, où 7 à 20% de la population sont des porteurs chroniques (présence de l'antigène AgHBs dans leur sérum sur deux prélèvements faits à 6 mois d'intervalle).

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

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

Modes de transmission

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

I.3.2.1.1.10 Physiopathologie de l'infection par le virus de l'hépatite B

Le VHB pénètre par voie sanguine ou sexuelle et gagne le foie par voie sanguine. On ne connaît pas le site de multiplication primaire. Etant peu cytolitique, c'est l'intensité

variable du conflit entre ce virus et les défenses immunitaires qui détermine la gravité de l'infection et le polymorphisme clinique de l'hépatite B. Les défenses immunitaires mettent en jeu deux mécanismes: les lymphocytes T qui attaquent et détruisent les cellules malades, les lymphocytes B qui synthétisent les anticorps spécifiques neutralisant les virus circulants (Gerlich, 2013).

✓ **L'hépatite B aiguë**

Dans près de 70% des cas, l'infection par le VHB est asymptomatique et l'apparition des signes cliniques dépend de l'âge du patient infecté. Le tableau clinique habituel comporte trois phases qui sont :

-La phase d'incubation elle dure entre 4 à 30 semaines.

-La phase pré-ictérique est peu spécifique, inconstamment marquée par une asthénie, un syndrome pseudo grippal des troubles digestifs et une éruption cutanée.

-La phase ictérique elle associe à la fois l'ictère et l'hépatomégalie dans 50% des cas puis la splénomégalie dans 25% des cas. L'ictère survient 1 à 2 semaine (s) après le contage et persiste 2 à 6 semaines.

Le diagnostic virologique de l'infection par le VHB repose sur des techniques sérologiques et techniques moléculaires.

✓ **Le diagnostic sérologique**

Le diagnostic sérologique se fait par la mise en évidence des antigènes viraux (AgHBs, AgHBe) et la quantification des anticorps dirigés contre les différents antigènes viraux: anticorps anti-HBs, anticorps anti-HBc totaux et anticorps anti-HBe.

-La détection de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (AgHBs) ainsi que les anticorps dirigés contre ce marqueur (Ac anti-HBs): L'AgHBs est retrouvé dans le sang un à trois mois après contamination. Il marque l'infection par le VHB. Sa détection dans le plasma ou le sérum peut être faite à l'aide des tests immunoenzymatiques de type ELISA. Pour tout échantillon présentant un résultat positif pour ce marqueur on réalise un deuxième test dit de neutralisation afin 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. Au cours de l'élimination du virus on note une apparition progressive des anticorps anti-HBs signe de l'arrêt de la réplication virale avec guérison ou d'une protection post vaccinale.

-La détection de l'antigène C du virus de l'hépatite B (AgHBc) et des anticorps dirigés contre ce marqueur (Ac anti-HBc): L'antigène HBc du virus de l'hépatite B n'est pas excrété dans le sérum. La détection de ce marqueur n'est donc pas réalisée dans la pratique

courante. Les anticorps dirigés contre cet antigène (Ac anti-HBc) apparaissent précocement dans le sérum ou le plasma des patients et signent la preuve d'un contact par le VHB. La fraction IgM anti-HBc peut être recherchée et dosée parallèlement aux anticorps anti-HBc totaux à l'aide des techniques immunoenzymatiques. Cette fraction IgM anti-HBc est détectée dans les cas des primo-infections et/ou des cas de réactivation.

-Le système antigène HBe et anticorps anti-HBe: L'antigène HBe (AgHBe) est détectable dans le sérum et ou le plasma par les méthodes immunoenzymatiques (ELISA), immunodiffusion et électrosynérèse. Ce marqueur témoigne une réplication virale. La disparition de l'AgHBe mais aussi l'apparition des Ac anti-HBe témoigne une évolution favorable chez le patient infecté. Cependant la présence des Ac anti-HBe seule ne suffit pas pour affirmer une absence de réplication virale. Dans certains cas, malgré la présence des Ac anti-HBe, l'ADN viral reste détectable preuve que l'infection poursuit toujours son évolution.

✓ **Le diagnostic moléculaire**

L'ADN du VHB peut être détecté et éventuellement quantifié dans le sérum, soit par des techniques d'hybridation au moyen de sondes spécifiques ou par amplification génique. Les techniques d'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) du génome viral sont les plus sensibles et permettent également après séquençage de révéler des variants ou mutants.

Les techniques de détection et de quantification: La présence de l'ADN traduit la production de virions complets infectieux qui passent dans la circulation sanguine et reflète l'intensité de réplication virale intra-hépatocytaire. La charge virale permet donc d'évaluer l'évolution de l'infection et de décider d'un traitement. Avec les progrès de la biologie moléculaire, de multiples tests avec des seuils de détection et de quantification très bas ont été développés.

Les techniques de détection des variants ou des génotypes: Les génotypes du VHB peuvent être détectés par diverses techniques mais la technique de référence repose sur l'amplification, le séquençage et analyse phylogénétique des séquences. La comparaison des séquences du génome entier et ceux du gène S a montré des résultats similaires à savoir une identification des génotypes A à H du VHB. Le seul problème avec la méthode d'identification via le gène S est l'absence d'identification des éventuelles recombinaisons entre les souches. Bien que la méthode de séquençage de la totalité du génome permette d'identifier de nouveaux génotypes et/ou des recombinants inter-génotypes, cette méthode n'est pas sensible à la détection des mélanges de population. Pour remédier à ce problème, les techniques telles que l'hybridation sur support solide à l'aide de sondes spécifiques dans la région préS1 (Line probe assay : LiPA ; et Genotype specific probe assay : GSPA) ainsi que

les techniques permettant l'analyse par polymorphisme de restriction (RFLP : Restriction fragment length polymorphism) ont également été développés.

La recherche des variants S: La méthode de référence repose sur le séquençage de la région d'intérêt du fait du nombre et de la variété des mutations rencontrées. Il n'existe pas encore de technique consensus pour l'analyse des mutants. Les amorces utilisées lors de l'amplification et du séquençage doivent être choisies dans les régions conservées. Certaines méthodes permettent de détecter les mutations dans le cadre de lecture ouverte du gène S (Bayer Diagnostics Trugene HBV kit) tandis que d'autres permettent de rechercher les mutations dans la région antigénique majeure de l'AgHBs quel que soit le génotype (Purdy, 2007).

La recherche des variants précore: La recherche des mutants pré-C ou dans le promoteur du core au cours des hépatites chroniques permet de distinguer les patients en rémission des patients infectés par un mutant préC (Akarca et Lok, 1995; Guarnieri *et al.*, 2006; Koschel, Oed, Gerelsaikhan, Thomssen et Bruss, 2000; Ni, Chang, Hsu et Tsuei, 2003). Les mutations sont mises en évidence soit par des techniques dites « maison » soit par des méthodes standardisées qui ne permettent que de cibler les mutations bien définies.

La recherche des variants dans la polymérase: La méthode de référence repose sur le séquençage du domaine transcriptase inverse qui permet de détecter l'ensemble des mutations dites de résistance quel que soit le traitement antiviral utilisé. Tout comme la détection des mutants précore, les mutations sont mises en évidence par des méthodes standardisées qui ne permettent que de cibler les mutations bien définies.

La recherche des formes persistantes de l'ADN du VHB : Lors de la phase de rémission d'une hépatite chronique, l'ADN viral peut persister dans le noyau des cellules infectées, intégrées dans le génome sous forme d'ADNccc. Cette forme d'ADN peut être détectée par Southern Blot ou par des techniques de PCR basées sur l'utilisation des amorces spécifiques choisies de part et d'autre du gap du génome viral, de sorte que seul l'ADNccc soit amplifié. Outre l'ADNccc la persistance de l'infection par le VHB se caractérise également par la présence de l'ADN intégré chez le patient. Cet ADN peut être détecté dans les biopsies hépatiques. La plupart des techniques utilisées reposent sur l'amplification des jonctions VHB-génome humain suivie d'une analyse de séquences ou d'une hybridation par Southern Blot.

I.3.2.1.1.11 Prévention et traitements de l'hépatite virale B

Les modalités de transmission du VHB étant connues, la prévention repose sur des mesures générales visant à prévenir les maladies sexuellement transmises et les expositions au sang et aux produits biologiques. En milieu de soins, les conduites à tenir et le matériel à

utiliser doivent être bien définis. Elles concernent le personnel mais aussi les patients porteurs de virus. Des mesures spécifiques consistent à exclure du don de sang, de tissus ou d'organes les sujets porteurs de l'AgHBs et/ou de l'anticorps anti-HBc. Les dons en lactarium doivent également être contrôlés et les dérivés du sang stables sont sécurisés. Enfin, il faut également lutter pour un respect scrupuleux des règles d'hygiène non seulement en milieu médical mais également à domicile dans l'entourage d'un patient infecté (Hou, Liu et Gu, 2005; Mahoney, 1999).

I.3.2.1.1.12 Virus de l'hépatite B et carcinome hépatocellulaire

L'infection par le virus de l'hépatite B représente le principal facteur de risque associé au développement du carcinome hépatocellulaire à la surface du globe (Arbuthnot et Kew, 2001; El-Serag, 2011a). Cette infection est impliquée dans plus de 50% des cas de CHC (El-Serag, 2012a) dont plus de 80% des cas dans les pays de l'Asie de l'Est et ceux d'Afrique noire (Arbuthnot et Kew, 2001).

Diverses études ont montré la forte implication de certaines mutations virales de même que certains génotypes (Chan *et al.*, 2004; Sarma *et al.*, 2012; Sunbul, 2014; H.-I. Yang *et al.*, 2008) et/ou l'augmentation du taux de réplication virale (Chu *et al.*, 2002a; Mendy *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012) sur le développement du carcinome hépatocellulaire. Les études réalisées en Asie ont révélé une très forte implication du génotype C du VHB sur son développement (Chan *et al.*, 2004). Les multiples mutations associées au développement du CHC ont été décrites dans divers gènes du virus (T. Liang *et al.*, 2013). Parmi ces mutations, nous pouvons citer:

-Les mutants Pré-S et S : Les régions Pré-S1 et Pré-S2 du VHB sont les plus variables et cette hyper variabilité fait en sorte que les mutations affectant ces régions soient fortement impliquées dans le développement des maladies chroniques du foie telles que la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (S. Liu *et al.*, 2009; H.-I. Yang *et al.*, 2008). Les mutations qui affectent le gène Pre-S sont généralement les délétions et les substitutions (Chen *et al.*, 2006). Nous avons par exemple le cas de la mutation F141L au niveau de Pre-S2 chez les patients infectés par le génotype C du VHB (T. Liang *et al.*, 2013). On peut également citer la mutation A181T du gène S, cette dernière est plus fréquente chez les patients présentant des échecs thérapeutiques (Villet *et al.*, 2008, p. 200). La mutation M204I du même gène est

fortement impliquée au développement du CHC chez les patients cirrhotiques de plus de 50 ans (Hosaka *et al.*, 2010).

-Les mutants Pré-C et C: Ces régions sont cruciales à la réplication du virus. Les modifications affectant la réplication virale sont capables d'influencer la progression vers la chronicité et le CHC (Fang *et al.*, 2008; Jammeh, Tavner, Watson, Thomas et Karayiannis, 2008; Yuen *et al.*, 2008). Plusieurs études ont démontré la forte implication des mutants Pré-C/C sur la prédisposition aux maladies chroniques du foie et la progression vers le CHC. Ces mutations sont: A1762T/G1764A, T1753V, G1896A, G1899A, G1613A, C1653T, C1914G et G1613A (Du *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2012; Malik, Singhal, Albanyan, Husain et Kar, 2012; Tatsukawa *et al.*, 2011).

-Les mutations du gène x: Les mutations du gène x du VHB ont également été reportées dans diverses études comme facteurs accentuant la progression vers le CHC. Ces mutations sont généralement les délétions et les insertions. Parmi ces mutations on peut citer : C1485T, les mutations du codon 130 (AAG pour ATG) et 131 (GTC pour ATC) (Kuang *et al.*, 2004; J.-H. Lee, Han, Lee, Park et Kim, 2011; Minemura *et al.*, 2005; Muroyama *et al.*, 2006).

I.3.2.1.2 Le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C est l'une des principales causes du carcinome hépatocellulaire; l'infection par le VHC est responsable de plus de 25% des cas de CHC dans le globe (El-Serag, 2011a).

I.3.2.1.2.1 Historique de la découverte

Dans les années 1970, en développant des tests sérologiques pour la détection des virus des hépatites A (VHA) ou B (VHB) chez les patients atteints d'hépatites, Feinstone et collaborateurs observèrent que certains patients étaient séronégatifs pour le VHA et le VHB, ils en déduisirent l'existence d'un agent inconnu pouvant causer des hépatites non A non B (NANBH) (Feinstone, Kapikian, Purcell, Alter et Holland, 1975).

En 1978, Alter et son équipe démontrèrent qu'au moins un des agents responsables des hépatites « Non A- Non B » était un agent transmissible, en infectant des chimpanzés à partir de sérum de 4 patients atteints de NANBH. Par ailleurs, le fait que le sérum de patients atteints d'une hépatite chronique restait infectieux, montrait que le nouvel agent était actif à long terme. En 1983, des travaux révélèrent que le chloroforme annulait le pouvoir infectieux

de l'agent responsable des NANBH (Bradley *et al.*, 1983; Feinstone *et al.*, 1983), suggérant que cet agent était probablement un virus enveloppé. Par la suite, (Bradley *et al.*, 1985), démontrèrent que cet agent infectieux était probablement un petit virus, car pouvant passer à travers une membrane de 80 nm de diamètre. Mais aucune technique classique ne permit la mise en évidence de particules virales, du génome ou d'antigènes du virus.

L'avancée majeure fut la caractérisation du génome du virus en 1989 par Choo et son équipe (Choo *et al.*, 1989) grâce aux techniques de biologie moléculaire. Ils utilisèrent du sérum de chimpanzés infectés par l'agent causal des NANBH pour produire une large banque d'ADNc qui fut clonée dans un bactériophage λ gt11. Cette banque d'expression fut alors criblée par des sérums de patients humains atteints de NANBH. Les auteurs isolèrent le clone codant un antigène reconnu par les sérums de plusieurs patients. Par ailleurs, Choo et son équipe montrèrent que l'ADNc correspondant ne dérivait pas d'un ARN codé par le génome de primate, démontrant ainsi son origine virale. L'agent causal des NANBH ainsi identifié, prit alors le nom de Virus de l'hépatite C (VHC). Au cours de la même année, Kuo *et al.* mirent au point un test ELISA pour détecter la présence du VHC chez des patients et montrèrent que ce virus était la principale cause des NANBH transfusionnelles à travers le monde (Kuo *et al.*, 1989). Cela a permis de mettre en évidence la première cause de transmission de ce virus à savoir la transfusion sanguine.

I.3.2.1.2.2 Classification et structure du virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C est un virus à ARN, de la famille de *Flaviviridae* qui comprend 3 genres: Les *Pestivirus*, responsables de pathologies animales; les *Flavivirus*, regroupant plusieurs virus responsables d'arboviroses comme le virus de la dengue ou de la fièvre jaune et les *Hepacivirus*, incluant les différents génotypes du VHC. Les virus de cette famille ont des caractéristiques communes comme l'organisation génomique et la stratégie de répllication (Chevaliez et Pawlotsky, 2006).

Le virus de l'hépatite C est un petit virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre. Son génome est un ARN monocaténaire de polarité positive non segmenté de près 9 600 nucléotides de long codant une polyprotéine d'environ 3 000 acides aminés. Une capsidie icosaédrique enveloppe le génome. Cette capsidie est elle-même située dans une enveloppe lipidique d'origine cellulaire où sont insérées deux glycoprotéines d'enveloppes virales transmembranaires, E1 et E2 (Chevaliez et Pawlotsky, 2006; Moradpour et Penin, 2013). Elles jouent un rôle dans la morphogénèse des virions et leur infectiosité.

I.3.2.1.2.3 Structure du génome du virus de l'hépatite C

Le génome du VHC (**Figure 9**) possède un seul cadre de lecture ouvert, flanqué en 5' et 3' de régions non codantes. Cette molécule est schématiquement divisée en trois régions distinctes de 5' en 3'(Chevaliez et Pawlotsky, 2006).

I.3.2.1.2.4 Propriétés physico-chimiques du virus de l'hépatite C

Il est sensible à de nombreux désinfectants tels que l'hypochlorite de sodium à 1%, éthanol à 70%, glutaraldéhyde à 2%, formaldéhyde. Le VHC peut rester stable à 37°C pendant 60 minutes à 56°C pendant 30 minutes, mais pas à une température supérieure à 60°C. C'est un virus qui ne peut être inactivé par l'exposition à l'ultra violet (Bradley *et al.*, 1983; Feinstone *et al.*, 1983).

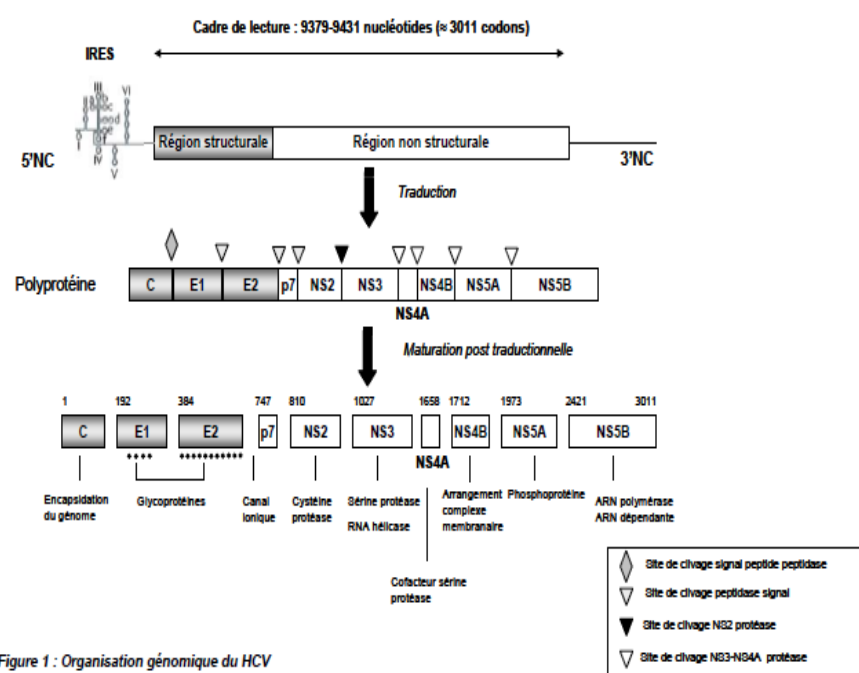


Figure 1 : Organisation génomique du HCV

Figure 9: Organisation génomique du VHC (Selimovic *et al.* 2012)

I.3.2.1.2.5 Organisation génomique du virus de l'hépatite C

✓ Le cadre de lecture ouvert

Le cadre de lecture de l'ARN code pour une poly-protéine d'environ 3000 acides aminés qui est secondairement clivée par les protéases cellulaires et virales pour générer sept

protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) et trois protéines structurales : une protéine de capsid C et deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2) (Penin, 2003; Penin, Dubuisson, Rey, Moradpour et Pawlotsky, 2004). Les protéines virales 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 de la maladie virale C (Selimovic *et al.*, 2012).

✓ **Protéines structurales**

La protéine de capsid : La capsid est une phosphoprotéine très basique constituée de 191 acides aminés et de 21 Kda. Elle résulte d'un clivage protéolytique du peptide signal situé à l'extrémité C-terminale de la protéine C. Elle possède un segment hydrophobe à son extrémité C terminale et reste localisée dans le cytoplasme, à proximité des membranes péri-nucléaires et du réticulum endoplasmique. Très conservée d'une souche virale à l'autre, elle est également fortement antigénique (Chevaliez and Pawlotsky, 2006). Sa principale fonction est de servir à la formation des capsides virales par polymérisation. La protéine C interfère aussi avec les récepteurs du *TNF* impliqués dans les réponses immunes ainsi que dans l'apoptose, et est également capable de moduler l'expression de certains gènes du cycle cellulaire. En effet, elle active le *c-myc* et le *c-fos*, deux gènes qui commandent la synthèse d'oncoprotéines et déclenchent une prolifération désordonnée des cellules. La protéine de capsid a la capacité d'inactiver le gène codant pour la protéine p53. Ce gène est un gène suppresseur de tumeurs qui est impliqué dans le processus d'apoptose. Cette activité oncogénique de la capsid C pourrait contribuer à augmenter le risque d'hépatocarcinome dans les infections chroniques au virus de l'hépatite C (McLauchlan, Lemberg, Hope et Martoglio, 2002).

Les glycoprotéines d'enveloppes E1 et E2 : Elles ont des poids moléculaires respectifs de 30 et 70 Kda; ce sont les constituants de l'enveloppe virale (S Duvet *et al.*, 1998; Sandrine Duvet, Foulquier, Mir, Chirat et Cacan, 2004). Ce sont des protéines transmembranaires avec un ectodomaine N-terminal et une région hydrophobe C-terminale d'ancrage dans le réticulum endoplasmique. Les 27 acides aminés N-terminaux de

E2 constituent la région hypervariable 1 (HVR1) exposée à la surface de E2 (Weiner *et al.*, 1991, 1992). Cette région HVR1 renfermerait au moins un des déterminants antigéniques capables d'induire les anticorps neutralisants (Farci *et al.*, 1994, 1996). Les protéines virales E1 et E2 ont un rôle important dans le cycle cellulaire du VHC et sa réplication (Chevaliez et Pawlotsky, 2006; Moradpour, Penin et Rice, 2007). En effet, elles participent à l'assemblage

des particules infectieuses et jouent un rôle crucial dans l'adsorption du virus et sa pénétration dans la cellule hôte (Lavie, Goffard et Dubuisson, 2006).

Les glycoprotéines E₁ et E₂ peuvent former des hétérodimères homogènes E₁/E₂, constitués de protéines natives et stabilisés par des interactions non covalentes (voie productive) (Lavie *et al.*, 2006; Moradpour et Penin, 2013). Ces oligomères seraient des précurseurs du complexe fonctionnel ayant un rôle actif dans le processus de pénétration du VHC dans la cellule hôte. Ils n'interagissent pas avec les molécules « chaperons », du fait de leur structure repliée. Les protéines E₁ et E₂ peuvent aussi s'assembler sous forme d'agrégats hétérogènes liés par des ponts disulfures et interagissant avec des molécules chaperons (voie non productive) (Lavie *et al.*, 2006). Cette forme d'assemblage pourrait jouer un rôle de régulation négative de la formation des particules virales et de la réplication.

✓ Protéines non structurales

Protéine p7 : C'est un petit peptide de 63 acides aminés. Elle se situe au niveau de la membrane plasmique, ses extrémités N et C-terminales étant orientées vers l'extérieur de la cellule et un petit domaine hydrophile vers la face cytoplasmique. La protéine P7 n'est pas essentielle à la réplication de l'ARN viral (Chevaliez et Pawlotsky, 2006; Moradpour *et al.*, 2007) mais il a été néanmoins suggéré qu'elle jouerait un rôle dans l'assemblage des particules infectieuses (Chevaliez et Pawlotsky, 2006; Moradpour *et al.*, 2007).

Protéine NS2 : Elle a un poids moléculaire de 23 kDa et est formée de 810 à 1020 acides aminés. C'est une protéine transmembranaire insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique et qui forme avec l'extrémité N terminale de la protéine NS3, une protéase auto-catalytique dont l'activité semble stimulée par le zinc. Une analyse cristallographique du domaine catalytique de NS2 montre que son site actif est formé de résidus Histidine143, Glutamate13 et Cystéine184. La région N-terminale de NS2 dérive du clivage de la jonction P7-NS2 par une peptidase cellulaire « signal ». Toutefois après le clivage de NS2-3, le domaine protéasique de NS2 semble jouer un rôle précoce lors de la morphogénèse virale (Chevaliez et Pawlotsky, 2006; Moradpour *et al.*, 2007).

Protéine NS3-NS4A : La protéine NS3 est une protéine hydrophile de 70 Kda (631 acides aminés) qui présente une triple activité enzymatique : une fonction sérine protéase, une fonction hélicase et une fonction ATPase, essentielles à la réplication virale (R. Bartenschlager et Lohmann, 2000; Ralf Bartenschlager, Cosset et Lohmann, 2010). Ainsi, la protéine NS3 est une cible idéale dans le traitement contre le VHC (Meylan *et al.*, 2005). La fonction sérine protéase de la NS3 permet le clivage de toutes les protéines non structurales situées en aval de NS3. La triade catalytique est formée des résidus Histidine (57) 1083,

Aspartate (81) 1107 et Serine (139) 1165. Cette fonction est zinc-dépendante et nécessite la formation d'un complexe stable avec l'extrémité N-terminale de NS4A, petite protéine transmembranaire de 54 acides aminés. La résolution de la structure tridimensionnelle de NS3 et du complexe NS3-NS4A a révélé que cette protéase est proche des chymotrypsines (Paul, Hoppe, Saher, Krijnse-Locker et Bartenschlager, 2013; Romero-Brey *et al.*, 2012). L'activité hélicase de NS3, conférée par son domaine C terminal, pourrait servir à séparer les brins positifs et négatifs de l'ARN viral au moment de la réplication, à abolir les structures secondaires des ARN positifs pour favoriser la traduction des protéines virales, et à permettre l'accès de l'ARN polymérase virale aux structures très repliées, telles que l'IRES et la région X de l'extrémité 3' non codante. La structure tri-dimensionnelle de la NTPase/hélicase, associée ou non à un acide nucléique, a été récemment résolue en cristallographie aux rayons X ; et des inhibiteurs spécifiques sont en cours de développement. La portion hélicase de NS3 est également impliquée dans la régulation de la transduction du signal par la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA) et semble pouvoir influencer la survie et la prolifération de sa cellule hôte (Chevaliez et Pawlotsky, 2006; Moradpour *et al.*, 2007).

Protéine NS4B : La NS4B est une protéine hydrophobe de 30 Kda intégralement associée aux membranes du réticulum endoplasmique (Chevaliez et Pawlotsky, 2006). Bien que la fonction exacte de NS4B ne soit pas connue, il a été démontré que cette protéine induisait un réseau membranaire qui servirait de tremplin à la réplication de l'ARN. Ce domaine jouant un rôle crucial dans la réplication du VHC, il pourrait constituer une cible de choix pour le développement d'un vaccin contre le VHC (Sklan et Glenn, 2006).

Protéine NS5A : La Protéine NS5A modérément hydrophile existe sous deux formes distinctes, de poids moléculaires respectifs 56 et 58 kDa et résultant d'une phosphorylation différentielle des résidus sérines, au niveau des régions situées en amont de l'acide aminé 2350. NS5A est localisée à proximité des membranes du réticulum endoplasmique où elle est associée aux autres protéines non structurales au sein du complexe de réplication (Moradpour et Penin, 2013). Elle participerait à la régulation de l'activité de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN et possède de nombreuses propriétés qui pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de l'infection (Ranjith-Kumar et Kao, 2006). Privée de sa partie N-terminale, NS5A possède une fonction d'activateur transcriptionnel *in vitro* qui pourrait jouer un rôle physiologique. NS5A possède en effet un signal de localisation nucléaire situé en aval du site transactivateur et semble pouvoir être clivée par une protéase cellulaire en amont de ce site.

L'implication de cette fonction reste à déterminer, en particulier dans la carcinogenèse induite par le virus. De nombreuses interactions entre NS5A et des protéines cellulaires de l'hôte ont également été rapportées, dont le rôle physiologique reste hypothétique (Ranjith-Kumar et Kao, 2006).

Protéine NS5B : La NS5B est une protéine de 68 Kda qui correspond à l'ARN polymérase ARN dépendante indispensable à la réplication de l'ARN viral. Sa structure tri-dimensionnelle présente une structure en main droite classique, avec des « doigts » et un « pouce » définissant une « paume ». Elle interagit avec l'extrémité 3' de l'ARN viral et la polymérisation aboutit à la copie du génome complet (brin négatif à partir d'un brin positif, ou brin positif à partir d'un brin négatif). Les mécanismes intimes de la réplication virale restent incomplètement élucidés. Des inhibiteurs spécifiques de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN du VHC sont en cours de développement (Ranjith-Kumar et Kao, 2006).

I.3.2.1.2.6 Le cycle de multiplication du virus de l'hépatite C

✓ Le cycle de réplication virale

L'étude du cycle réplicatif du VHC était difficile du fait de l'absence de systèmes cellulaires, capables de répliquer *in vitro* le virus. Néanmoins, la mise au point de nouveaux modèles d'études tels que les VHCcc, a permis une avancée majeure dans la compréhension du cycle viral. Le cycle réplicatif du VHC se déroule en plusieurs étapes résumées dans la **Figure 10**).

I.3.2.1.2.1.7 La variabilité génétique du virus de l'hépatite C

Le génome du VHC est très variable comme pour la majorité des virus à ARN ou des virus qui passent par un intermédiaire ARN pendant leur réplication (Simmonds, 1995). Cette variabilité résulte d'une part du manque de fidélité des ARN polymérases ARN-dépendantes, environ une erreur par copie du génome, et d'autre part du manque d'activité de relecture et de correction des erreurs de ces enzymes responsables de la réplication. Cette dérive génétique crée de nombreuses mutations qui peuvent apparaître dans une souche donnée. La fixation de la mutation dans le génome dépend de la valeur répliquative de celui-ci et des virus résultants qui les portent. La variabilité de séquence du VHC n'est pas uniformément répartie sur le génome, ce qui suggère des pressions de sélection différentes selon la fonction des

régions du génome (Echeverría, Moratorio, Cristina et Moreno, 2015; Simmonds, 1995; Torres-Puente *et al.*, 2008).

Cette variabilité provoque des modifications de l'infection et des maladies associées. Elle est observée à différents niveaux. Dans un premier temps, le virus s'est diversifié en différents génotypes au cours du temps et de l'évolution des populations humaines.

I.3.2.1.2.7 La variabilité génétique du virus de l'hépatite C

Le génome du VHC est très variable comme pour la majorité des virus à ARN ou des virus qui passent par un intermédiaire ARN pendant leur répllication (Simmonds, 1995). Cette variabilité résulte d'une part du manque de fidélité des ARN polymérases ARN-dépendantes, environ une erreur par copie du génome, et d'autre part du manque d'activité de relecture et de correction des erreurs de ces enzymes responsables de la répllication. Cette dérive génétique crée de nombreuses mutations qui peuvent apparaître dans une souche donnée. La fixation de la mutation dans le génome dépend de la valeur répllicative de celui-ci et des virus résultants qui les portent. La variabilité de séquence du VHC n'est pas uniformément répartie sur le génome, ce qui suggère des pressions de sélection différentes selon la fonction des régions du génome (Echeverría *et al.*, 2015; Simmonds, 1995; Torres-Puente *et al.*, 2008).

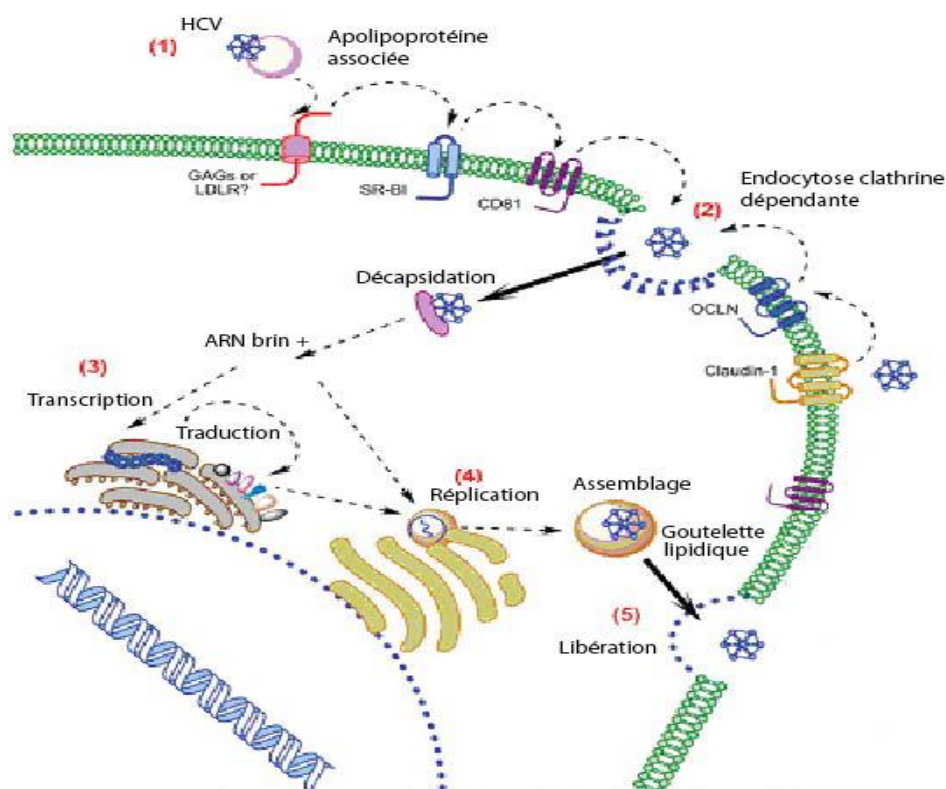


Figure 10: Cycle réplicatif du HCV (Moradpour *et al.* 2007; Bartenschlager *et al.* 2010)

Cette variabilité provoque des modifications de l'infection et des maladies associées. Elle est observée à différents niveaux. Dans un premier temps, le virus s'est diversifié en différents génotypes au cours du temps et de l'évolution des populations humaines. L'évolution des virus vers la formation de génotypes individualisés est probablement due à la création d'isolats géographiques. Cette variabilité s'exprime à deux niveaux qui sont: quasi-espèces et génotypes (Farci *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2011).

-Les quasi-espèces

Chez un individu infecté, le VHC circule sous la forme d'un mélange complexe et en équilibre instable de particules virales génétiquement distinctes mais apparentées, car tous dérivés du même inoculum. Ces particules virales sont issues des erreurs de transcription commises par l'ARN polymérase qui sont de l'ordre de 10^{-3} substitutions de nucléotides sur la totalité du génome. Ces erreurs sont prédominantes au niveau des régions hypervariables mais les régions 5'NC sont hautement conservées. Sous l'effet de la pression immunitaire de l'hôte, il s'opère au cours du temps une sélection de mutants du virus ou « quasi-espèces », assurant ainsi sa survie (Farci *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2011). La capacité d'adaptation des quasi-espèces virales aux modifications de l'environnement joue un rôle important dans la physiopathologie de l'infection, aussi bien dans les mécanismes de persistance virale que dans la résistance aux traitements antiviraux.

-Les génotypes

L'analyse phylogénique des séquences nucléotidiques complètes de nombreuses souches du VHC, de provenances géographiques diverses, a mis en évidence 7 génotypes différents désignés par les chiffres de 1 à 7 en fonction de la date de leur découverte (Smith *et al.*, 2014). A l'intérieur des génotypes les souches peuvent être classées en sous-types, identifiées par des lettres minuscules.

L'étude de régions plus restreintes du génome viral a permis de classer schématiquement les souches en établissant des arbres phylogénétiques. Par exemple, deux souches virales appartiennent au même génotype et sous-type lorsque l'homologie de séquence nucléotidique entre elles est de plus de 90%. Lorsque cette homologie de séquences est de 80%, les souches appartiennent au même génotype, mais à des sous-types différents. Enfin, en dessous de 70% d'homologie, les souches sont considérées comme appartenant à deux types différents (Simmonds, 1995; Smith *et al.*, 2014).

-Distribution géographique des différents génotypes du VHC

La répartition géographique du VHC reflète l'histoire épidémiologique du virus. Les génotypes 1, 2 et 3 rendent compte de la majorité des infections à travers le monde avec des prévalences variables d'une région à l'autre. Les sous-types 1a, 1b, 2a et 2b sont prédominants en Amérique du Nord, au Japon et en Europe. Les sous-types 3a, 3b et 6 sont plus fréquents en Asie du Sud-Est (Petruzzello, Marigliano, Loquercio et Cacciapuoti, 2016). En Afrique de l'Ouest le sous-type 2a est responsable de la majorité des infections tandis que le génotype 4 est majoritairement observé en Afrique Centrale (Ali-Mahamat et Njouom, 2015; Njouom *et al.*, 2009) et en Afrique du Nord (Bahri *et al.*, 2011). Le génotype 5 est fortement prévalent en Afrique du Sud (Al Naamani, Al Sinani et Deschênes, 2013).

De façon générale, le génotype 1b est associé à la transfusion tandis que les génotypes 1a et 3a sont rencontrés chez les malades ayant un antécédent de toxicomanie. La relation entre les différents génotypes du VHC et la progression de la maladie hépatique reste controversée. Certaines études avaient également montré une association entre le génotype 1b, la cirrhose et le cancer du foie et plaidaient pour un rôle plus pathogène du génotype 1b (Mondelli et Silini, 1999; O'Riordan *et al.*, 1998; Zein, 2000) .

I.3.2.1.2.8 Epidémiologie du virus de l'hépatite C

✓ Répartition mondiale

A l'échelle mondiale, l'infection par le virus de l'hépatite C est un enjeu majeur de santé publique de par son mode de transmission et son évolution vers la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (El-Serag, 2011a; Mailly, Robinet, Meuleman, Baumert et Zeisel, 2013). L'infection est aussi bien présente dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement, mais elle touche plus durement ces derniers.

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la prévalence du VHC dans la population mondiale serait de 3%, ce qui représente près de 170 millions de personnes. L'incidence annuelle du VHC serait de 3 à 4 millions. Il y a entre 120 et 130 millions d'individus atteints d'hépatite C chronique à travers le monde qui encourent le risque de voir leur atteinte hépatique évoluer vers la cirrhose et/ou le carcinome hépatocellulaire. Enfin, plus de 350 000 individus décèdent chaque année des pathologies hépatiques VHC. Le virus de l'hépatite C est omniprésent sur les cinq continents.

La répartition des différents génotypes et sous-génotypes du VHC n'est pas la même selon les régions du globe (**Figure 11**) dans certaines parties du monde les données ne sont même pas disponibles.

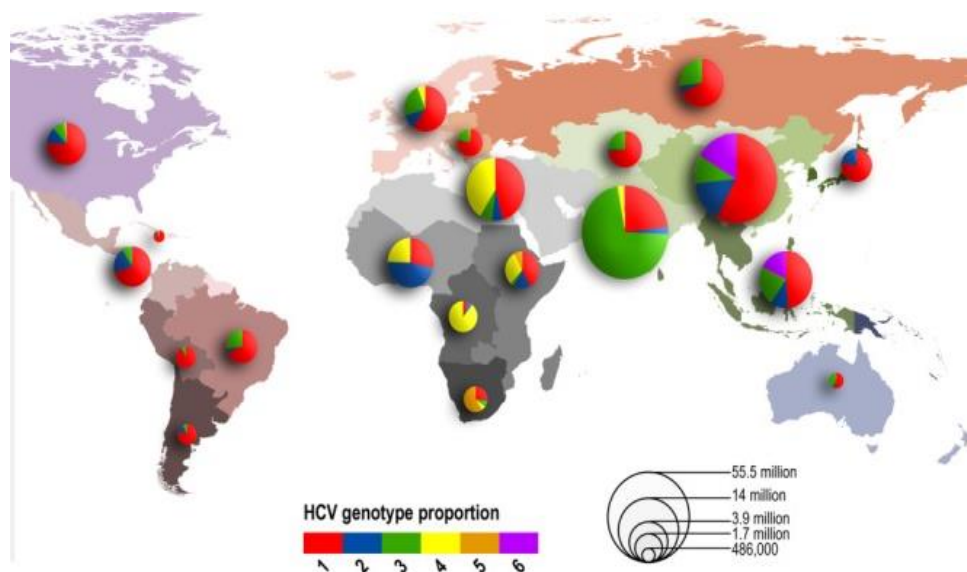


Figure 11: Prévalence du VHC et répartition des différents génotypes dans le monde (Messina *et al.* 2015)

✓ Modes de transmission

Le virus de l'hépatite C est essentiellement transmissible par voie parentérale. Il y a donc une prévalence considérable à l'échelle mondiale chez les personnes transfusées avec du sang non testé, les hémophiles et les toxicomanes (Minola, Baldo, Baldovin, Trivello et Floreani, 2006; Puig-Basagoiti *et al.*, 2000; Tibbs, 1995). La transmission par voie sexuelle est discutée et peu fréquente et serait de l'ordre de 4 à 10 % dans certains groupes à risque tels que les prostitués, les personnes à partenaires multiples et les homosexuels (Dienstag, 1997; Rooney et Gilson, 1998). La transmission materno-fœtale représente 3% des cas d'infections chez les nouveaux nés mais uniquement chez des mères virémiques (Martin et Denis, 1994). Cependant, certains facteurs de risque notamment ceux liés à la co-infection avec le VIH, seraient à l'origine d'un taux de transmission élevé (Salazar-Vizcaya *et al.*, 2016).

1.3.2.1.2.9 Physiopathologie de l'infection par le virus de l'hépatite C

La transmission est interhumaine, elle résulte du contact du sang d'un sujet indemne avec le sang d'un sujet infecté, de manière directe (transfusion) ou indirecte (matériel d'injection contaminé réutilisé) (Salazar-Vizcaya *et al.*, 2016; Tibbs, 1995).

Jusqu'au début des années 90, date à laquelle le test sérologique de dépistage des anticorps anti-VHC dans les dons de sang et des mesures sanitaires visant à réduire le risque transfusionnel ont été mis en œuvre; la transfusion de produits sanguins stables et labiles a eu un rôle majeur dans la diffusion de l'infection à travers l'Europe de l'Ouest et l'Amérique du Nord. Dans les pays industrialisés, l'usage de drogues par voie intraveineuse et le partage de

seringues ou du matériel de préparation des drogues entre toxicomanes intraveineux, restent le mode de transmission majeur du VHC. Le risque de contamination lors des soins médicaux a eu un rôle majeur dans la transmission du virus de l'hépatite C jusqu'à la fin des années 90 (Escobar-Gutiérrez *et al.*, 2012, p.; Kouyos *et al.*, 2014; White *et al.*, 2007).

Le risque de transmission sexuelle est considéré comme très faible chez les couples hétérosexuels stables (Rooney et Gilson, 1998). Cependant, ce risque peut être augmenté en cas de multi-partenariat sexuel et il s'agit souvent de co-infection avec le VIH (Salazar-Vizcaya *et al.*, 2016). La transmission de la mère à l'enfant est estimée à 5-10 % et dépend de la charge virale de la mère (Martin et Denis, 1994).

L'infection chronique induite par le VHC produit à long terme une cytolysé hépatique silencieuse et une destruction progressive des hépatocytes, accompagnée d'une inflammation due à la réponse immunitaire cellulaire. Cette réponse à l'agression virale entraîne une régénération constante, mais seulement en partie, des hépatocytes, conduisant à un processus dynamique de fibrogénèse qui aboutit à une fibrose progressive du foie (Hoshida, Fuchs, Bardeesy, Baumert et Chung, 2014; Mailly *et al.*, 2013).

✓ **Le cycle de réplication**

Après une contamination, le virus de l'hépatite C infecte les hépatocytes, les lymphocytes B et les monocytes. Puis il s'attache à la surface de la cellule hôte et y pénètre par endocytose. Une interaction entre les glycosamino glycanes situés à la surface des cellules cibles et la glycoprotéine d'enveloppe E2 est indispensable pour l'entrée du virus. Le récepteur cellulaire du VHC est la tétraspanine CD81. Une fois les virions liés aux récepteurs CD81 ceux-ci migrent et transfèrent ces virions aux protéines de jonction claudine-1 et occuline. La liaison entre ces deux récepteurs et les récepteurs CD81 permettent l'entrée du virus par invagination (Ashfaq, Javed, Rehman, Nawaz et Riazuddin, 2011; Ralf Bartenschlager *et al.*, 2010; Ralf Bartenschlager, Lohmann et Penin, 2013; Chevaliez et Pawlotsky, 2006).

Les virions peuvent se fixer aussi spécifiquement aux récepteurs des lipoprotéines de faible et de très faible densité et ainsi s'internaliser. Ces lipoprotéines ont donc un rôle dans les étapes précoces de l'infection. D'une part elles facilitent les liaisons et l'internalisation du virus, d'autre part, elles favorisent le masquage des virions et rendent ainsi l'action des anticorps neutralisants nulle. Après fusion des membranes, les génomes viraux sont libérés dans les endosomes acides puis largués dans le cytoplasme. Ils serviront de matrice pour la réplication de l'ARN viral et d'ARN messagers pour la synthèse des protéines virales.

I.3.2.1.2.10 Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C est responsable de diverses lésions hépatiques. La chronicité survient après une incubation moyenne de 6 semaines. La durée de l'incubation est influencée par le mode de contamination, qui détermine la quantité de l'inoculum viral. L'hépatite C évolue dans 80% des cas vers une phase chronique.

La chronicité de l'hépatite C serait liée à certains facteurs tels que l'âge au moment de l'infection, le sexe et la race de la personne infectée ainsi que l'apparition des symptômes pendant la phase aigüe. Des manifestations extra-hépatiques ont été observées chez des personnes souffrant d'une hépatite C chronique (Cainelli, 2008; Niu, Zhang et Tong, 2016).

I.3.2.1.2.11 Diagnostic virologique de l'hépatite virale C

Le diagnostic virologique à partir du sérum et/ou le plasma repose sur des tests directs de biologie moléculaire permettant la détection d'ARN du VHC et des tests indirects de sérologie permettant la détection des anticorps anti-VHC (Chevalier and Pawlotsky, 2007). Le diagnostic repose sur des examens cliniques, biologiques et histologiques. L'objectif de la prise en charge est d'apprécier l'atteinte hépatique, d'établir un pronostic pour évaluer l'histoire naturelle de la maladie et surtout de proposer un traitement dont le bénéfice sur la morbi-mortalité est escompté.

Les tests sérologiques utilisés sont basés sur l'utilisation des tests immunoenzymatiques de troisième génération (EIA) qui permettent de détecter des anticorps dirigés contre différents génotypes (Chevalier and Pawlotsky, 2007). Ces anticorps sont détectables à partir de sept à huit semaines après infection. En général lorsqu'un résultat est douteux on procède à la confirmation par la mise en évidence de l'ARN viral.

-Le diagnostic biologique

La prise en charge initiale comporte toujours une numération-formule sanguine avec un dosage des plaquettes à la recherche d'une thrombopénie due à un hypersplénisme ainsi qu'un bilan hépatique avec recherche de cytolyse par dosage de l'Alanine Amino Transférase (ALAT) et de l'Aspartate Amino Transférase (ASAT) sanguines, d'une cholestase par dosage de la bilirubine et de la γ GT sanguines, d'insuffisance hépatocellulaire et d'une inflammation. L'électrophorèse des protéines et surtout le dosage des gammaglobulines sériques sont utiles pour estimer la chronicité. Pour le diagnostic et le suivi biologique des infections liées au

VHC, il existe deux types de tests virologiques : indirects et directs (Gupta, Bajpai et Choudhary, 2014).

Les tests sérologiques utilisés sont basés sur l'utilisation des tests immuno-enzymatiques de troisième génération (EIA) qui permettent de détecter des anticorps dirigés contre différents génotypes (Chevalier and Pawlotsky, 2007). Ces anticorps sont détectables à partir de sept à huit semaines après infection. En général lorsqu'un résultat est douteux on procède à la confirmation par la mise en évidence de l'ARN viral.

Les tests indirects sérologiques détectent les anticorps anti-VHC spécifiques dans le sérum, par des tests immuno-enzymatiques ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) de troisième génération. Les tests directs détectent, quantifient et caractérisent les composants de la particule virale circulante tels que l'ARN du VHC par la technique de transcription inverse de l'ARN viral en ADNc suivie de la polymérisation en chaîne de l'ADN ou RT-PCR. Cette dernière est d'une grande sensibilité analytique et permet une quantification virale (Albertoni, Castelo Girão et Schor, 2014; Firdaus, Saha, Biswas et Sadhukhan, 2015). Elle est utilisée pour apprécier la réponse thérapeutique. Ces tests de diagnostic sont capitaux pour le diagnostic de l'infection, la décision de traiter, le choix de la meilleure prise en charge thérapeutique, la durée de traitement et l'évaluation de la réponse au traitement. Le diagnostic biologique étiologique d'hépatite C chronique repose sur deux critères : la présence d'anticorps anti-VHC dans le sérum par ELISA et la recherche de virus circulants par l'ARN génomique par RT-PCR.

✓ **Tests indirects**

Il s'agit de tests immuno-enzymatiques ELISA de 3^{ème} génération. Ils détectent les IgG qui témoignent d'un contact plus ou moins ancien avec le VHC, de 4 à 10 semaines suivant le début de l'infection. Ces tests détectent un mélange d'anticorps dirigés contre les épitopes de la protéine de la capsid et de plusieurs protéines non structurales telles que NS3, NS4 et NS5. D'un point de vue réglementaire, toutes les sérologies douteuses ou positives font l'objet d'un 2^{ème} test réalisé sur un nouveau prélèvement avec un réactif différent du premier. La sensibilité et la spécificité des tests sérologiques actuels sont comprises entre 97% et 100% pour les patients à haut risque d'infection par le VHC. Lors d'une hépatite C aiguë, les premiers anticorps à apparaître sont dirigés contre la région NS3 et ce sont également ceux qui perdurent le plus longtemps après la guérison. Les anticorps anti-VHC sont détectables au stade d'hépatite aiguë dans 50 à 70% des cas et au cours d'une hépatite chronique C dans 90 à

98% des cas avec les tests de dépistage, seulement 1 à 3 mois après la contamination (Gupta *et al.*, 2014).

La détection d'anticorps anti-VHC est le premier test de dépistage de par sa facilité d'utilisation et son faible coût. Toutefois une sérologie positive ne suffit pas pour affirmer qu'une infection virale par le VHC persiste. C'est uniquement la présence de l'ARN du VHC qui permettra de confirmer de l'existence actuelle d'une infection virale par le VHC. Contrairement aux anticorps, le génome du VHC est détectable par PCR dès le début de l'infection aiguë. Le diagnostic de l'infection repose donc sur la recherche des anticorps et de l'ARN du VHC. La détermination sérologique du génotype (sérotypage) par une méthode ELISA permet de distinguer les anticorps correspondant aux 6 génotypes mais ne permet pas de différencier les sous-types (Albertoni *et al.*, 2014).

✓ **Tests directs**

Quatre techniques principales permettent de détecter, caractériser et quantifier les composants de la particule virale.

-Les tests de détection qualitative de l'ARN du virus

Ils reposent sur des techniques d'amplification de l'ARN ou du signal par PCR. La technique utilisée pour la recherche qualitative de l'ARN du VHC est la RT-PCR. C'est un test qualitatif ou quantitatif de mesure de la charge virale. La RT-PCR est très sensible puisque le seuil de détection de la charge virale va jusqu'à 10 UI/mL. Sa spécificité est de 97 à 99%. Ce test permet d'identifier l'ARN viral dès une semaine après la contamination.

Les tests quantitatifs de mesure de la charge virale sont préconisés lorsqu'un traitement est indiqué. La charge virale n'est pas corrélée à l'intensité des lésions hépatiques et elle n'est pas nécessaire pour le diagnostic de la maladie. Cependant, sa valeur initiale et son évolution pendant les 12 premières semaines de traitement sont prédictives de la réponse aux traitements et permettent d'en moduler la durée. En effet, la virémie est corrélée à la concentration intra-hépatique du virus et reflète donc la réplication du VHC dans le foie.

La charge virale peut ainsi être mesurée par des techniques d'amplification de la cible ou du signal. La RT-PCR quantitative mesure de manière précise la charge virale du patient infecté. La quantification se fait à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques du VHC appliquées sur le produit d'amplification par PCR (Albertoni *et al.*, 2014).

-Le test de détection et le dosage de l'antigène de capsid

C'est un test ELISA. Il permet de réduire la fenêtre sérologique qui précède la séroconversion. L'antigène de capsid apparaît peu après l'ARN viral, 1 à 2 jours environ, et

bien avant la séroconversion anti-VHC. Il a été montré que 1pg/mL d'antigène de capsid correspond à environ 16 000 copies d'ARN VHC/mL. Le titre de cet antigène C est corrélé à la charge virale et représente donc un marqueur indirect de la réplication virale. Le test quantitatif ELISA ne détecte pas une charge virale inférieure à 20 000 UI/mL mais, son coût est moins élevé que la PCR (Tillmann, 2014; H.-Q. Zhang *et al.*, 2007).

-Les tests de génotypage moléculaire

Ils permettent de déterminer le génotype du VHC du patient à traiter. La réponse au traitement étant fortement influencée par la charge virale pré thérapeutique et le génotype, ceux-ci sont donc indiqués lorsqu'un traitement est envisagé mais aussi pour l'étude épidémiologique et phylogénétique du virus. Il existe deux méthodes:

La première repose sur l'hybridation d'amplicons obtenus par RT-PCR avec l'ARN viral sur des sondes génotypes spécifiques. La seconde repose sur le séquençage de la région NS5B du génome, c'est la technique de référence, ou sur le séquençage NS3. En pratique clinique, le séquençage se fait sur la région 5' non codante du virus après PCR et est suivi d'une comparaison avec une banque de séquences de référence.

I.3.2.1.2.12 Traitements de l'hépatite virale C

Le principal objectif du traitement de l'hépatite chronique C est d'obtenir l'éradication du virus permettant la guérison de l'infection et l'arrêt de la progression vers la cirrhose. Les objectifs secondaires de la thérapie sont de ralentir la progression de la fibrose et, chez les patients où la cirrhose est déjà constituée, de prévenir les complications et de retarder le développement d'un carcinome hépatocellulaire (Yau et Yoshida, 2014).

I.3.2.1.2.13 Prévention de l'hépatite virale C

Le développement d'un vaccin préventif afin d'éradiquer le VHC est à l'étude. Ce vaccin doit être capable d'induire une production d'anticorps, neutralisant efficacement le virus et les cellules T mémoires; en reconnaissant spécifiquement ce dernier. Cependant, du fait de la grande variabilité génétique du VHC, la construction d'un vaccin efficace contre tous les génotypes reste un véritable challenge (Naderi *et al.*, 2014; Stoll-Keller, Barth, Fafi-Kremer, Zeisel et Baumert, 2009).

I.3.2.1.2.14 Hépatite virale C et carcinome hépatocellulaire

Le virus de l'hépatite C est le deuxième facteur de risque fortement impliqué dans le développement du carcinome hépatocellulaire. Globalement, il est responsable de plus de 25% de cas de CHC dans le globe (El-Serag, 2012a; Goossens et Hoshida, 2015). Tout

comme l'infection par le VHB, l'augmentation de la charge virale (Noh *et al.*, 2016; Shindoh, Hashimoto et Watanabe, 2015), certains génotypes (de Oliveria Andrade *et al.*, 2009; Pecic *et al.*, 2011) et diverses mutations virales (Jaspe *et al.*, 2012) sont fortement impliqués dans le développement du carcinome hépatocellulaire.

Les mutations de VHC associées au développement du CHC sont celles qui touchent les gènes Core et NS5B du génome du virus de l'hépatite C. Parmi les mutations qui touchent le gène core on peut citer: R70Q, L91M, C91M et celles qui touchent le gène NS5B on a: D310N, D244N, Q309R, C316N, T329I, S326G et A333E. Ces mutations engendrent une non réponse au traitement par les antirétroviraux disponibles et par conséquent la progression vers le carcinome hépatocellulaire (Akuta *et al.*, 2009, 2011; Seko *et al.*, 2013).

I.3.2.1.3 Le virus de l'hépatite Delta ou agent Delta

I.3.2.1.3.1 Historique de la découverte

En 1977, Mario Rizzetto, un hépato-gastro-entérologue de Turin en Italie, mit en évidence un nouvel antigène nucléaire jusque là inconnu, dans les cellules hépatocytaires de patients infectés chroniquement par le virus de l'hépatite B (VHB) (M. Rizzetto *et al.*, 1977). Cet antigène, dont la présence était toujours associée à l'infection par le VHB, n'était jamais retrouvé dans les biopsies hépatiques de patients non infectés par le VHB. De plus, cet antigène ainsi que les anticorps correspondants n'étaient détectés que chez certains porteurs chroniques du VHB.

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 (M. Rizzetto *et al.*, 1977, 1981). 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 nommé l'agent Delta puis virus de l'hépatite Delta ou VHD.

I.3.2.1.3.2 Structure du virion

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 (Mario Rizzetto, 2009).

La particule virale VHD est constituée d'une ribonucléoprotéine enveloppée d'une membrane contenant l'AgHBs. En microscopie électronique, le virus de l'hépatite delta apparaît comme une particule virale hétérogène d'un diamètre compris entre 28 et 39 nm (**Figure 12**). La ribonucléoprotéine de l'VHD comporte un génome ARN monocaténaire circulaire de polarité négative et 2 protéines appelées sHDAg (small hepatitis delta antigen) ou petite protéine delta ou p24 et LHDAg (large hepatitis delta antigen) ou grande protéine Delta. La ribonucléoprotéine s'entoure d'une enveloppe constituée par la membrane du réticulum endoplasmique contenant les protéines L, M et S du complexe HBs de HBV. Mais dans des proportions différentes de celles de l'HBV : 95 / 5 / 1 de S / M / L pour l'VHD contre 4 / 1 / 1 pour l'HBV (M. Rizzetto *et al.*, 1981).

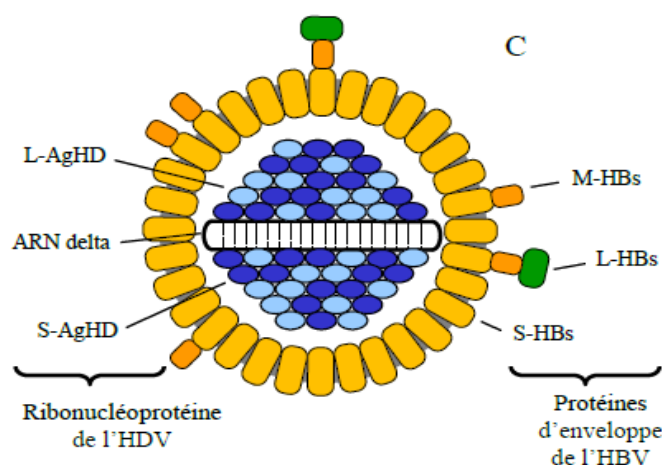


Figure 12: Particule virale du virus de l'hépatite Delta (Giersch and Dandri 2015)

I.3.2.1.3.3 Organisation génomique

Avec un génome d'environ 1700 nucléotides (**Figure 13**), l'VHD est le plus petit virus connu capable d'infecter l'Homme. Il est à noter qu'il existe des similitudes entre l'ARN VHD et l'ARN de certains agents infectant les plantes, notamment les viroïdes. En effet, le VHD et les viroïdes ont une structure simple brin d'ARN circulaire et fermé en forme de bâtonnet. De même, l'ARN VHD et les viroïdes contiennent des séquences d'ARN possédant une activité catalytique appelée les ribozymes (Gudima, Chang, Moraleda, Azvolinsky et Taylor, 2002; Taylor, 2006).

Enfin, ni l’VHD ni les viroïdes ne sont capables d’encoder leurs propres polymérasés. Cependant, il existe une différence majeure entre les viroïdes et le VHD : le VHD possède une phase de lecture ouverte qui code p24 et p27 (Makino *et al.*, 1987).

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.

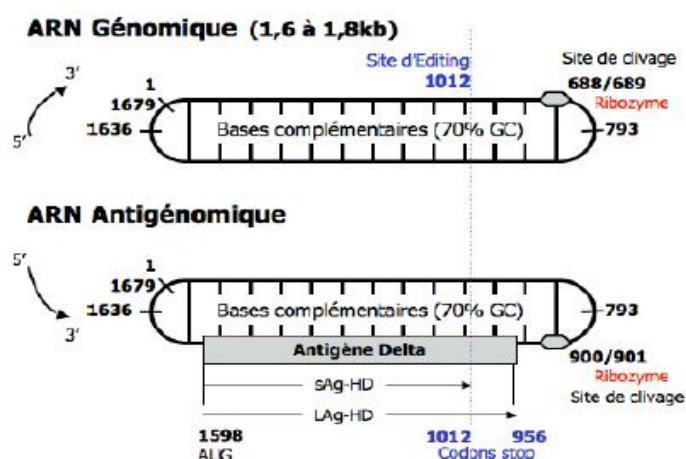


Figure 13: Représentation du génome de l’hépatite Delta (Makino *et al.* 1987)

Cette molécule ressemble à l’ARN infectieux des viroïdes des plantes mais, en diffère par sa longueur et sa capacité de coder une protéine dont il existe deux formes. Le génome du VHD est donc constitué de deux domaines : le domaine viroïde et la région codante. L’information génétique est transcrite en ARNm de petite taille (800 nt) complémentaire de l’ARN génomique. Trois formes différentes d’ARN sont observées au cours du processus de réplication du VHD: le génome, l’antigénome et l’ARN messenger. L’antigénome servira de matrice à la synthèse de l’antigène delta.

I.3.2.1.3.4 Cycle de 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 infecté par le ChHVB et à la marmotte infectée par le

WHBV. Le cycle de réplication (**Figure 14**) très complexe ne nécessite pas la présence du VHB pour la réplication de l'ARN Delta.

-La fixation aux récepteurs, l'internalisation et les étapes précoces de réplication : A cette étape le virion reconnaît et s'attache à l'hépatocyte à travers le récepteur cellulaire. Le récepteur du VHD a été découvert récemment; il est identique à celui du VHD. C'est un co-transporteur d'ions sodium/taurocholate codé par le gène SLC10A1 également connu comme protéine NTCP. Cette protéine est un transporteur transmembranaire normalement impliquée dans le transport des acides biliaires exprimés dans le foie (Yan *et al.*, 2012).

-La synthèse des protéines virales : Dans le cytoplasme, l'ARNm sert de matrice pour la synthèse de l'antigène delta qui se présente sous deux formes qui sont Large-HDAg et Small-HDAg. Small-HDAg retourne dans le noyau et assure la réplication virale tandis que Large-HDAg assure la régulation négative de la réplication du virus (Gudima *et al.*, 2002; Taylor, 2006).

-L'assemblage et la sortie des particules : Le processus de modification post traductionnelle de la L-HDAg telle la phénylation du résidu de la cystéine du côté C-terminal lui confère l'habileté à se fixer sur l'AgHBs du VHB et assurer ainsi l'assemblage de la particule virale. 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 tandis que sa sumoylation accroît la synthèse de l'ARN génomique et de l'ARNm (Abbas et Afzal, 2013; Gudima *et al.*, 2002).

I.3.2.1.3.5 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 (Bonino, Heermann, Rizzetto et Gerlich, 1986; Moraleda *et al.*, 2000).

I.3.2.1.3.6 Variabilité génétique

Comme la plupart des virus à ARN, l'VHD présente une grande variété génétique. Les mutations sont entre autres favorisées par les polymérases cellulaires et les Adénosine Déaminase des ARNs doubles brins (ADAR), qui peuvent reconnaître d'autres régions du génome et de l'antigénome en dehors du site d'édition en position 1012. Le virus de l'hépatite delta a été découvert en Italie chez des patients provenant du Sud du pays, ayant été pour la

plupart contaminés avant 1986 par transfusion sanguine (Alvarado-Mora, Locarnini, Rizzetto et Pinho, 2013; S. A. Hughes, Wedemeyer et Harrison, 2011; Shakil *et al.*, 1997).

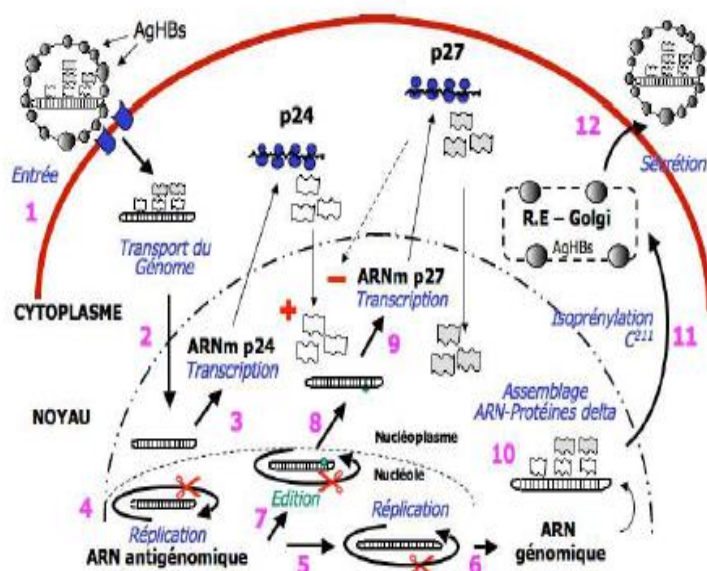


Figure 14: Le cycle de réplication de l'hépatite delta adapté suivant (Abbas and Afzal 2013)

1. Fixation sur un récepteur cellulaire et entrée dans la cellule.
2. Entrée du génome viral dans le noyau.
3. Transcription de l'ARNm de la p24 et traduction.
4. Transcription de l'ARN antigénomique.
5. Réplication
6. Synthèse de l'ARN génomique.
7. Edition.
8. Passage de l'ARN édité vers le cytoplasme.
9. Synthèse de l'ARNm de la p27 puis traduction.
10. Assemblage p27 / p24 / ARN pré-génomique.
11. Isoprénylation de la p27 sur la cystéine 211 (C211), export de la nucléocapside dans le R.E et le Golgi.
12. Sécrétion des virions.

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

nucléotide et par an est de $1,14 \times 10^{-3}$ à $1,28 \times 10^{-3}$) et plusieurs souches virales peuvent co-exister (S. A. Hughes *et al.*, 2011; Jacobson *et al.*, 1985; Wu, 2006).

Récemment, l'analyse phylogénétique a permis de classer les souches virales de VHD identifiées dans le monde en huit génotypes (**Figure 15**). En dehors du génotype I qui est ubiquitaire, les autres génotypes présentent une distribution géographique assez distincte. Le génotype II est retrouvé au Japon, en Taiwan et en Russie ; le génotype IV est retrouvé au Japon et en Taiwan ; le génotype III est retrouvé dans le bassin Amazonien et les génotypes V, VI, VII et VIII ont une origine Africaine. On note une divergence de plus de 16% au sein du même génotype et de 20 à 40% entre des génotypes différents (Foupouapouognigni, Noah, Sartre et Njouom, 2011; S. A. Hughes *et al.*, 2011; Sadeghian *et al.*, 2015).

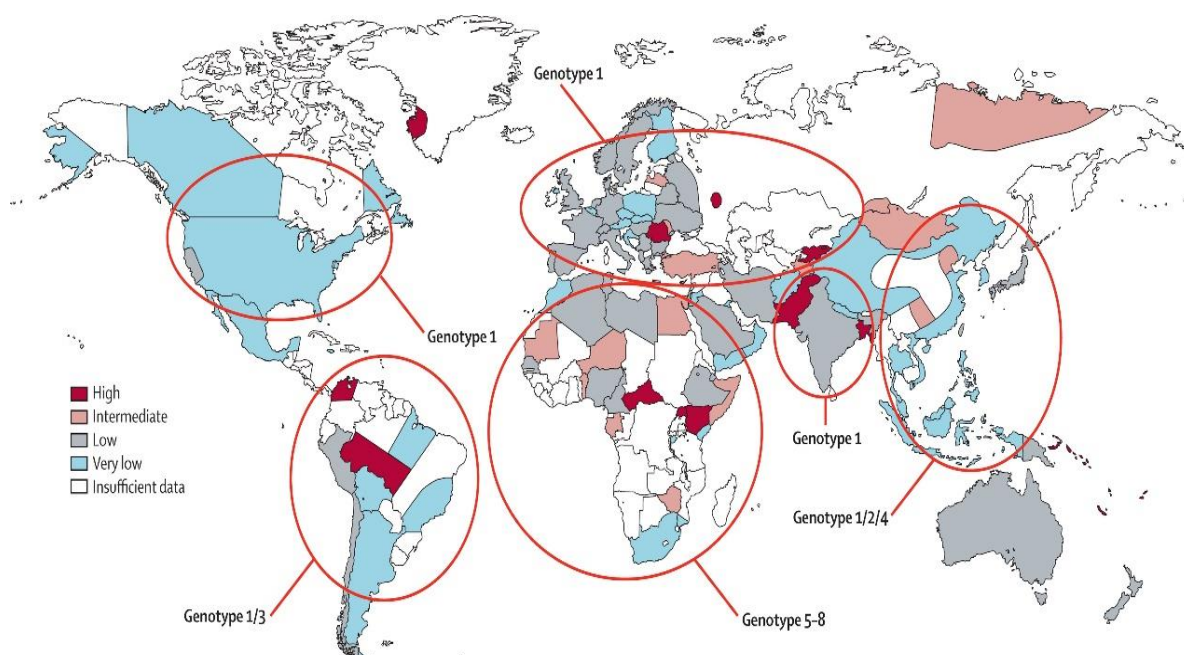


Figure 15: Répartition globale des génotypes du virus de l'hépatite Delta en rouge (Hughes *et al.* 2011).

I.3.2.1.3.7 Epidémiologie

L'homme est le réservoir naturel du VHD, mais ce dernier est capable d'infecter d'autres primates comme le chimpanzé (M. Rizzetto *et al.*, 1981; Mario Rizzetto, 2009), ainsi que des non primates comme la marmotte américaine (*Marmota monax*). Dans ce dernier cas, il utilise comme virus auxiliaire le virus de l'hépatite de la marmotte WHV.

L'épidémiologie de l'infection par le VHD est imparfaitement établie, car peu de véritables études ont été effectuées récemment dans le monde, en particulier dans les zones endémiques pour le VHB, et du fait de la relative absence d'outils diagnostiques sérologiques et moléculaires performants. En moyenne, la proportion de porteurs de l'antigène HBs infectés

par le VHD pourrait être de 5% à 20%. Soit, sur 400 millions de porteurs chroniques du VHB, environ 10-20 millions de porteurs du VHD (Ziaee et Azarkar, 2013).

Comme le VHD ne peut se développer qu'en présence d'une infection simultanée ou le plus souvent antérieure par le VHB, on pourrait imaginer avoir une distribution géographique du virus de l'hépatite delta superposable à celle du virus de l'hépatite B, ce qui n'est pas le cas. En particulier, alors qu'il existe des régions pour lesquelles la forte prévalence du VHB est associée à une forte prévalence du VHD (Afrique et Amérique du Sud), d'autres régions du globe, dans lesquelles HBV est prévalent semblent moins touchées par VHD (Asie). Ceci nous conduit à suggérer que certains facteurs comme l'âge lors de l'infection par l'HBV puissent faciliter ou non l'infection par l'VHD (Pascarella et Negro, 2011). En effet, on peut penser que l'infection par l'HBV à la naissance ou la petite enfance défavoriserait l'infection par le VHD, ce qui expliquerait le faible taux de le VHD observé dans certains pays ou régions de très fortes endémies pour l'HBV, comme la Chine ou l'Asie du Sud-Est (Alvarado-Mora *et al.*, 2013; Husa, Linhartová, Nemecek et Husová, 2005; Pascarella et Negro, 2011).

I.3.2.1.3.8 Pouvoir pathogène

Le VHD étant un virus satellite du VHB, l'infection ne se développe que chez des patients également infectés par le VHB soit lors d'une co-infection soit par surinfection. Le VHD 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 tandis que la forme fulminante intervient spécialement dans le cas de surinfection delta. Elle est plus fréquente dans les surinfections que dans les mono infections hépatite B et se caractérise par une nécrose massive des hépatocytes conduisant à un échec de la fonction hépatique et la mort du patient dans près de 80% des cas. Les formes chroniques par contre sont souvent plus sévères que les autres formes d'hépatites virales chroniques (Alvarado-Mora *et al.*, 2013; Wu, 2006).

Co-infection : La co-infection est à l'origine d'une hépatite aiguë. Deux pics d'élévation du taux des transaminases, séparés de 2 à 5 semaines, s'observent dans 10 à 20% des co-infections, reflets probables des différentes cinétiques de réplication virale. Au début de la maladie, l'AgHD n'est pas toujours détecté car l'antigénémie est très fugace. Les IgM anti-

HD prédominant. 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. 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 (S. A. Hughes *et al.*, 2011; Sadeghian *et al.*, 2015; Wu, 2006).

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 (Alvarado-Mora *et al.*, 2013; S. A. Hughes *et al.*, 2011; Motamedifar *et al.*, 2015).

I.3.2.1.3.9 Diagnostic

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 de la mise sous traitement du malade et enfin d'évaluer l'efficacité du traitement.

Diagnostic direct

– La recherche de l'AgHD a d'abord été réalisée par immunofluorescence directe sur coupes histologiques de foie après une biopsie, ce qui limite l'indication de cet examen. L'AgHD peut être aussi recherché dans le sérum par ELISA. Un agent dissociant expose l'AgHD inclus dans l'enveloppe de virus portant l'AgHBs. Cependant, l'antigénémie HD est précoce et fugace et de plus, la présence d'anticorps anti-HD dans le sérum du malade peut gêner la détection de l'AgHD (Brichler *et al.*, 2014).

– L'ARN du VHD peut être détecté et éventuellement quantifié dans le sérum, soit par des techniques d'hybridation au moyen de sondes spécifiques, soit par amplification génique. Les techniques d'amplification par RT-PCR (Reverse Transcriptase -*Polymerase Chain Reaction*)

et PCR en temps réel du génome viral sont les plus sensibles. La structure secondaire de l'ARN du VHD doit être dénaturée, puis rétro-transcrite par une transcriptase inverse avant l'amplification. Les amorces utilisées pour l'amplification sont complémentaires des régions conservées du génome (ribozymes et gène HD) et leur choix repose sur l'épidémiologie locale des génotypes (Brichler *et al.*, 2014; Le Gal *et al.*, 2005; Modahl et Lai, 2000).

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 (Olivero et Smedile, 2012).

I.3.2.1.3.10 Traitement et prévention

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 (Heidrich, Manns et Wedemeyer, 2013; Hsieh, Liu, Chen et Chen, 2006). Les premières études ont montré une efficacité transitoire variant de 0 à 60% en ce qui concerne la normalisation des transaminases, associée à une diminution de l'ARN-VHD et de l'AgHD dans le sérum et dans le foie, bien que l'AgHBs et les anticorps anti-HD restent présents dans le foie. Cependant, le bénéfice était transitoire et disparaissait après l'arrêt du traitement. Par la suite, des études contrôlées et randomisées ont montré qu'un traitement prolongé (48 semaines) et à haute dose (9 millions d'unités 3 fois par semaine) par l'IFN- α , permettait d'augmenter significativement la survie de ces patients. Dans ces études, la normalisation prolongée des transaminases sous IFN- α corrélait avec l'amélioration des fonctions hépatiques, la disparition des IgM anti-HD et la diminution de la charge virale delta (Hsieh *et al.*, 2006; Karayiannis, Saldanha, Monjardino, Farci et Thomas, 1991).

I.3.2.1.3.11 VHD 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 (Abbas *et al.*, 2015; Kage *et al.*, 1992).

I.3.2.1.4. Le virus de l'hépatite E

I.3.2.1.4.1 Historique

Le virus de l'hépatite E (VHE) est l'agent causal des formes d'hépatites virales aiguës à transmission féco-orale, dites non-A et non-B dont l'existence a été décrite pour la première fois en 1980 suite à l'épidémie de 1978 survenue dans la vallée du Kashmir en Inde. C'est en 1990 que le virus a été nommé hépatite E (Mehnaaz S. Khuroo et Khuroo, 2016; Mohammad Sultan Khuroo, 2011a).

I.3.2.1.4.2 Taxonomie et structure

Le VHE est classé depuis 2004 dans la famille des Hepeviridae, constituée de deux genres : le genre orthohepevirus regroupant les vertébrés terrestres et le genre piscihepevirus qui regroupe les poissons. Le genre orthohepevirus regorge quatre espèces allant de A-D (Sridhar, Teng, Chiu, Lau et Woo, 2017a). Différentes espèces sont présentes chez les mammifères et sont regroupées en 4 génotypes majeurs allant de 1 à 4. Un 5ème génotype a été isolé chez les oiseaux et constitue une espèce aviaire. Le virus correspond à une petite structure sphérique, de 27 à 33 nm de diamètre, non enveloppée (Debing, Moradpour, Neyts et Gouttenoire, 2016).

I.3.2.1.4.3 Les caractéristiques physico-chimiques

Le virus est relativement résistant dans le milieu extérieur comme tous les virus entériques non enveloppés. De par sa transmission oro-fécale, il peut résister à l'acidité gastrique et aux sels biliaires pour survivre dans le milieu intestinal et est détecté dans les eaux usées. In vitro, il est sensible à la chaleur, aux désinfectants habituellement utilisés dans l'inactivation des virus entériques (hypochlorite de sodium pour le traitement de l'eau, glutaraldéhyde pour la désinfection des surfaces) malgré une baisse significative de leurs efficacités en présence de matières organiques (Mehnaaz S. Khuroo et Khuroo, 2016).

I.3.2.1.4.4 Organisation génomique

Le génome est un ARN monocaténaire de 7,2 kilo-bases en moyenne constitué de 3 cadres de lecture partiellement chevauchants nommés ORF1, ORF2, ORF3. Il est encadré par 2 courtes séquences non codantes, de 27 à 32 nucléotides à l'extrémité 5' (coté ORF1) et de 65 à 74 bases à son extrémité 3' (côté ORF2), probablement impliquées dans la régulation de la traduction et répllication virale (Debing *et al.*, 2016) (**Figure 16**).

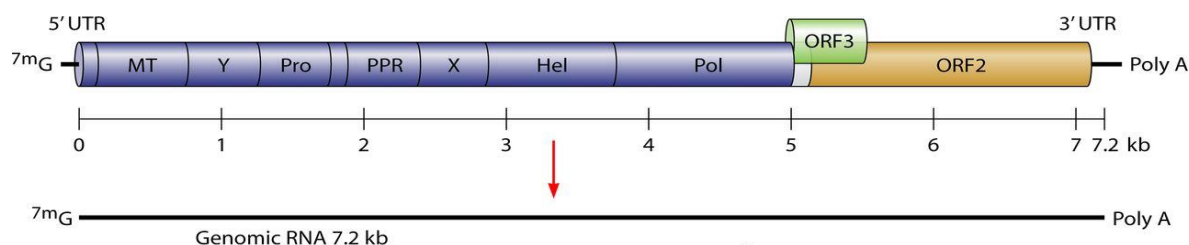


Figure 16: Représentation schématique de l'organisation génomique du virus de l'hépatite E (Ahmad *et al.*, 2011) (Mushahwar 2008).

Le cadre de lecture ORF1 localisé à l'extrémité 5' représente environ 5000 bases soit les 2/3 du génome (Debing *et al.*, 2016). Il code une polyprotéine non structurale de 186 kDa impliquée dans la répllication du virus. Plusieurs domaines fonctionnels conservés ont été identifiés dont une méthyltransférase, une hélicase, une cystéine protéase et l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus. Deux structures de type «stem-loop», localisées au niveau de la région non codante en 3' et de la queue poly-A, permettent une liaison spécifique de la polymérase au génome viral. Le complexe de répllication virale pourrait interagir au niveau du réticulum endoplasmique. La région hyper variable serait impliquée au niveau de l'efficacité de la répllication virale. Le domaine X possède une activité ADP-Ribose-Phosphatase. Le domaine Y est de fonction inconnue. Les mécanismes traductionnels et de maturation de l'ORF1 sont peu connus (Debing *et al.*, 2016; Kannan, Fan, Patel, Bossis et Zhang, 2009; Koonin *et al.*, 1992; Sridhar, Teng, Chiu, Lau et Woo, 2017b).

Le cadre de lecture de l'ORF2 situé à l'extrémité 3', d'une longueur de 2000 bases approximativement, code pour la protéine de capsid de 660 amino-acides (71 kDa). Il contient un peptide signal pour le réticulum endoplasmique et probablement 3 sites N-glycosylés impliqués dans l'infectivité du virus. La protéine de capsid interagit avec l'extrémité 5' du génome viral dans le processus d'encapsidation. La protéine contient plusieurs sites immunogènes et d'épitopes neutralisants (Debing *et al.*, 2016; Kannan *et al.*, 2009; Koonin *et al.*, 1992; Sridhar *et al.*, 2017b).

L'ORF3 contient environ 370 bases. Elle code une phosphoprotéine variable de 123 acides aminés (13 kDa) associée au cytosquelette (Debing *et al.* 2016). Elle est essentielle pour

l'infectivité du virus *in vivo* chez l'animal mais pas *in vitro*. Elle posséderait des fonctions dans la morphogénèse et pathogénèse du virus avec un rôle possible dans: - l'assemblage des virions en se liant avec l'ARN viral et la protéine de capsid, - l'excrétion des virions en étant présente à la surface des virions associée à des lipides, - la régulation de l'expression génique virale [28], - la régulation de la machinerie cellulaire en favorisant la survie cellulaire et en diminuant la réponse immunitaire de l'hôte (Debing *et al.*, 2016; Kannan *et al.*, 2009; Koonin *et al.*, 1992; Sridhar *et al.*, 2017b).

I.3.2.1.4.5 Cycle de réplication

Le cycle de réplication du virus de l'hépatite E a été établi à partir de modèles expérimentaux chez les primates (macaques et chimpanzés), complétés chez le porc, à partir de la propagation du virus sur des hépatocytes primaires. Il est similaire au modèle attribué aux virus à ARN de polarité positive. Les principales étapes de réplication virale sont présentées sur la **Figure 17**. Le virus se réplique dans le cytoplasme des hépatocytes. Les virions néoformés sont excrétés dans les canaux biliaires puis dans les selles (Ahmad, Holla et Jameel, 2011; Reyes, Huang, Tam et Purdy, 1993).

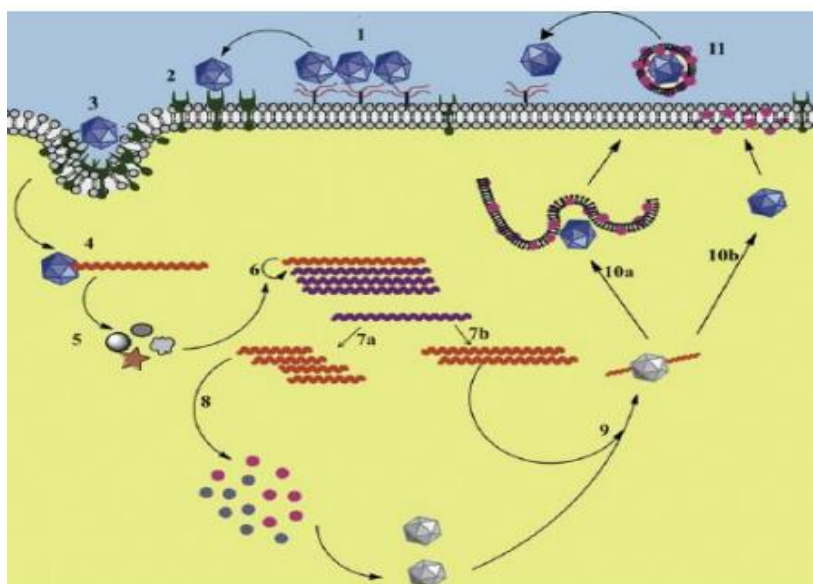


Figure 17: Cycle de réplication du VHE (Ahmad *et al.* 2011)

1 : Ralentissement des virions via des protéoglycanes, 2 : Attachement du virus, 3 : Internalisation, 4 : Décapsidation, 5 : Traduction des protéines non structurales, 6 : Synthèse de brins d'ARN négatifs, 7a,b : Synthèse d'ARN positifs subgénomiques, 8 : Synthèse des protéines structurales, 9 : Assemblage des virions, 10a,b : Excrétion des virions impliquant la protéine ORF3, 11 : Maturation virale extra-cellulaire.

I.3.2.1.4.6 Pouvoir pathogène

Les mécanismes impliqués dans la pathogénicité du VHE sont mal caractérisés. Il semble que les dommages causés par le virus soit plus le fait d'une réponse immunitaire cytotoxique qu'un effet cytopathogène direct du virus. En effet, la virémie précède de plusieurs jours les manifestations biochimiques et histopathologiques et il n'existe pas de preuve d'un effet cytopathogène direct du virus. Une réponse immune innée a été montrée en cas d'infection aiguë (Mohammad S. Khuroo, Khuroo et Khuroo, 2016; Teshale et Hu, 2011).

I.3.2.1.4.7 Voies de transmission

Plusieurs voies de contamination par le VHE sont connues **Figure 18**. Les voies de transmission possibles sont : 1) la voie féco-orale liée à une consommation d'eau ou d'aliments souillés 2) la voie alimentaire par ingestion de produits issus d'animaux contaminés 3) le contact avec des animaux infectés 4) la voie parentérale par transfusion 5) la voie maternofoetale (Kamar *et al.*, 2012; Kamar, Dalton, Abravanel et Izopet, 2014).

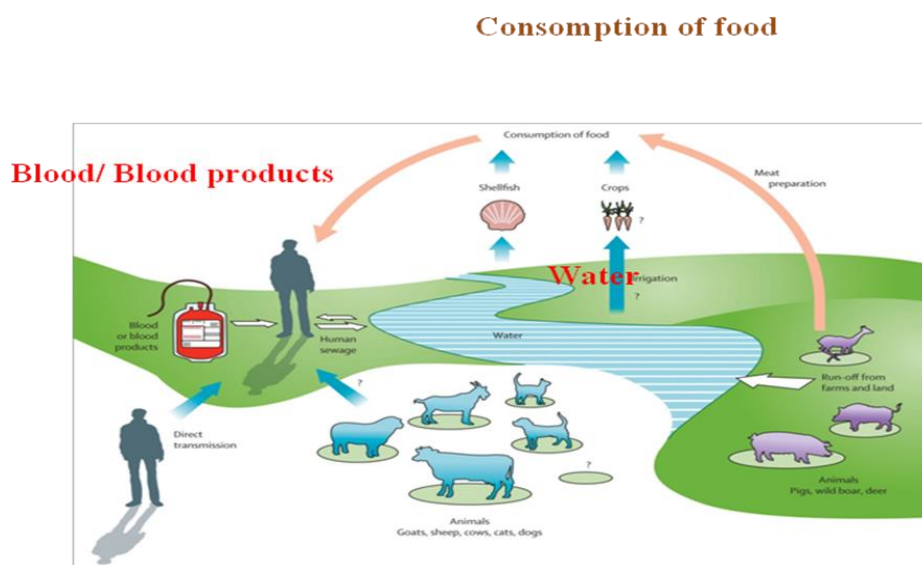


Figure 18: Les voies de transmission du VHE (Kamar *et al.*, 2012)

I.3.2.1.4.8 Epidémiologie du virus de l'hépatite E

L'hépatite E est la seconde cause des hépatites aiguës au globe. On estime qu'un tiers de la population mondiale a été infectée par le VHE principalement en Asie, Afrique, Proche Orient et Amérique Centrale. En Inde, le VHE serait responsable de 2,2 millions d'hépatites aiguës par an. Le virus est à la fois à l'origine d'épidémies et de cas sporadiques. Le génotype principalement impliqué est le 1 (Rein, Stevens, Theaker, Wittenborn et Wiersma, 2012).

L'hépatite E peut également progresser de l'aiguë à la phase fulminante et plus particulièrement chez les femmes enceintes ou la phase fulminante peut toucher 25% voire 40% des femmes (J. M. Hughes, Wilson, Teshale, Hu et Holmberg, 2010). Les caractéristiques épidémiologiques de l'infection par le VHE sont les mêmes depuis la première épidémie de New Delhi en Inde. Ce virus attaque plus les jeunes adultes mais on note des taux de mortalité élevés chez les femmes enceintes. Sa variabilité génétique montre une prédominance de génotypes (1-4) et 24 sous types avec un seul sérotype identifié pour le moment (Lu, Li et Hagedorn, 2006; Teshale et Hu, 2011)

La classification du VHE se base sur l'analyse complète du génome et/ou une large portion de 371 bases du cadre de lecture ORF1, concernant les nucléotides 80 à 450, donc le résultat trouvé est corrélé à l'analyse faite sur l'ensemble du génome. Ces 4 génotypes se différencient par leur répartition géographique et leur spectre d'hôte (M. S. Khuroo *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2006). Le génotype 1 a été isolé lors d'épidémies ou de cas sporadiques chez l'homme dans les régions tropicales et subtropicales en Afrique et en Asie où le virus est connu pour être endémique. Le génotype 2, isolé initialement au cours d'une épidémie à Mexico, a été décrit en Afrique de l'Est (Nigéria, Tchad, Namibie). Le génotype 3, mis en évidence initialement aux USA, il a été retrouvé depuis dans de nombreux pays industrialisés en Europe (Royaume-Uni, France, Pays-Bas, Espagne, Autriche, Grèce, Italie), au Japon, Australie, Nouvelle-Zélande (Mohammad Sultan Khuroo, 2011b; Teshale et Hu, 2011).

I.3.2.1.4.9 Présentation clinique du VHE

La présentation clinique de l'hépatite E est semblable au tableau d'hépatite aiguë causée par les autres virus hépatotropes (**Figure 19**). La durée d'incubation varie de 2 à 9 semaines avec une moyenne de 40 jours. Le spectre d'expression clinique est large allant de formes asymptomatiques à des hépatites fulminantes. Près de la moitié des cas seraient asymptomatiques ou pauci-symptomatiques. La symptomatologie la plus fréquemment rencontrée est une hépatite aiguë cytolytique d'évolution favorable. La phase prodromique est inconstante et se manifeste par une asthénie, de la fièvre et des troubles digestifs pendant 3 à 7 jours puis la phase d'état correspond à un ictère de 2 semaines. La fréquence des formes cholestatiques est de 20%. Les manifestations extra-hépatiques du virus sont rares (Kamar *et al.*, 2014; Krain, Nelson et Labrique, 2014).

Depuis quelques années, une évolution vers la chronicité a été décrite dans 3 contextes d'immunosuppression : maladie hématologique, transplantation, et infection par le virus de l'immunodéficience humaine et l'infection par une première hépatite B ou C (Atiq *et al.*, 2009a; Hamid *et al.*, 2002; Hoan *et al.*, 2015; Ramachandran *et al.*, 2004). Quelques cas ont été rapportés en France et au Japon chez des patients porteurs de lymphomes traités par chimiothérapie éventuellement associée à une greffe de cellules souches hématopoïétique. Concernant la population d'individus infectés par le VIH, 2 formes chroniques ont été décrites dont une d'évolution vers la cirrhose (Caron, Bouscaillou et Kazanji, 2012).

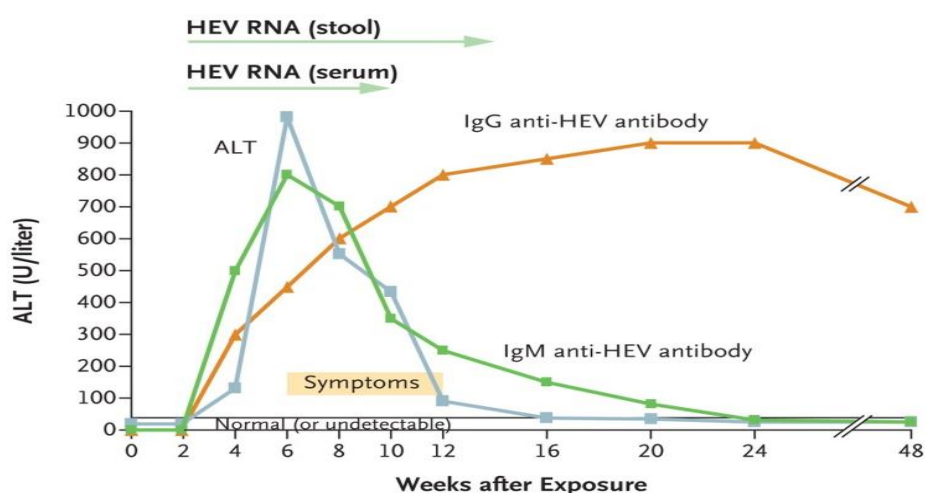


Figure 19: Cinétique d'évolution des marqueurs au cours de l'infection par le VHE (Kamar *et al.* 2014; Krain *et al.* 2014).

La majorité des hépatites E chroniques ont été décrites chez les patients transplantés de rein (ou rein-pancréas) et de foie (Halac *et al.*, 2012; Kurihara *et al.*, 2016). Une évolution cirrhogène plus rapide est rapportée principalement chez les transplantés rénaux (Riveiro-Barciela *et al.*, 2014). L'hépatite chronique est caractérisée par une fibrose portale progressive, une inflammation lymphocytaire souvent dense dans les espaces porte et des degrés variables de nécrose parcellaire (Kc, Mishra et Shrestha, 2006; KONDILI *et al.*, 2006).

I.3.2.1.4.10 Traitement et prophylaxie

Le traitement de l'hépatite aiguë est uniquement symptomatique. Concernant l'hépatite E chronique, une baisse de l'immunosuppression, l'utilisation d'interféron pégylé ou de Ribavirine donnent des résultats favorables sur quelques cas testés (Dalton et Kamar, 2016; Peters van Ton, Gevers et Drenth, 2015; van der Eijk, Pas et de Man, 2017). Les mesures prophylactiques reposent sur l'hygiène en zone d'endémie. Les mesures dans les pays

autochtones reposent sur des consignes alimentaires de cuisson à cœur des produits porcins ou de gibier notamment pour les groupes à risque (Shrivastava, Shrivastava, Ramasamy et Zaidi, 2014; Teshale et Hu, 2011).

I.3.2.1.4.11 Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique de l'hépatite E repose sur la détection du virus ou de son ARN et des marqueurs sérologiques spécifiques (IgM anti-VHE, IgG anti-VHE) (Aggarwal, 2013). Dans les pays développés, cette recherche doit être associée au contexte: séjour ou non en zone d'endémie. Elle doit également être réalisée chez tout sujet immunodéprimé ayant une hépatopathie chronique inexplicée. Le diagnostic biologique pragmatique d'une hépatite aiguë E, repose sur la présence d'au moins l'un des 3 paramètres suivants associé à une élévation des transaminases : la présence d'ARN dans le plasma ou le sérum, la positivité des IgM spécifiques et la majoration du taux des IgG anti-VHE lors de 2 prélèvements consécutifs. Les critères diagnostics de l'hépatite E chronique chez le patient immunodéprimé ne sont pas établis mais reposent communément sur la détection de l'ARN du virus pendant une durée supérieure à 6 mois associée le plus souvent, mais pas nécessairement à la présence d'IgM et ceci, quel que soit la réactivité des IgG (Aggarwal, 2013; Candido *et al.*, 2012; Khudyakov et Kamili, 2011).

Plusieurs techniques de mise en évidence directe du virus existent ou sont en cours de développement. Elles sont peu ou pas de pratique courante. D'une part, la mise en évidence directe des particules virales dans les selles par immuno-microscopie électronique n'est pas utilisée en routine du fait de la brièveté de l'excrétion fécale, de son inadaptation à l'examen d'un grand nombre d'échantillons et d'une sensibilité médiocre. D'autre part, la mise en culture du virus est limitée à des laboratoires spécialisés du fait d'une praticabilité restreinte et par manque d'efficacité constatée sur les hépatocytes primaires ou de multiples lignées cellulaires couramment utilisées. Enfin, concernant la recherche des antigènes viraux du VHE, les techniques Elisa destinées à détecter des protéines de capsid du VHE pour les génotypes 1 et 4 sont disponibles (Aggarwal, 2013; Elkady *et al.*, 2007).

I.3.3 Altérations génétiques du carcinome hépatocellulaire

Les altérations génétiques affectant le génome au cours du développement tumoral sont des altérations dites « somatiques » (du grec « somatikos », corporel). Elles concernent le soma

c'est à dire le corps et non la lignée germinale, ce ne sont donc pas des facteurs de risque à proprement parler car elles sont absentes chez l'individu indemne de cancer. Leur apparition et leur sélection sous forme de clones somatiques signent l'initiation de la maladie. Ces altérations peuvent être qualitatives et/ou quantitatives. Les altérations qualitatives correspondent aux diverses mutations ponctuelles des gènes impliqués dans la carcinogénèse (*TP53*, *CTNNB1*, *AXIN1*, *ARID1A*, *ARID2*, *RPS6KA3*, *NFE2L2*, etc...) tandis que les altérations quantitatives renvoient aux altérations entraînant la perte ou un gain de matériel chromosomique. Les altérations épigénétiques correspondent aux modifications affectant les histones et à l'hyperméthylation des promoteurs de certains gènes (Lévy, Renard, Wei et Buendia, 2002; M. Liu, Jiang et Guan, 2014; Nishida et Goel, 2011).

La carcinogénèse hépatique est un processus multi-étapes, complexe mettant en jeu des altérations moléculaires qui varient en partie d'une région géographique à une autre en raison de la variabilité de prévalence des facteurs de risque. Les mutations touchant le gène suppresseur de tumeurs *TP53* ou l'oncogène β -caténine (*CTNNB1*) sont largement impliquées dans la carcinogénèse hépatique. Plus récemment les mutations du promoteur du gène codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase (*TERT*) se sont imposées comme les plus importantes sur le plan numérique car elles concernent environ 60% des cas de CHC. Dans le cas des oncogènes, ces mutations peuvent être activatrices conduisant ainsi soit à une hyperactivité des protéines correspondantes, soit à une expression constitutive et/ou à la création d'une nouvelle protéine. A l'inverse, il peut s'agir de mutations inactivatrices affectant les gènes suppresseurs de tumeurs. La mutation d'un seul allèle suffit à conférer un avantage sélectif à la cellule. Outre les mutations, on peut également observer des pertes ou des gains des bras chromosomiques lors des carcinomes hépatocellulaires. Toutes ces altérations (mutations et anomalies chromosomiques) engendrent des modifications diverses au niveau des voies de signalisation de p53, de la voie de signalisation de Wnt/Béta-caténine, de la voie de contrôle du stress oxydant, de la maintenance chromatinienne et bien d'autres (Hussain, Schwank, Staib, Wang et Harris, 2007).

✓ Le gène de la p53, structure et fonctions

Le gène codant pour la protéine p53 (*TP53*) humaine est localisé sur le bras court du chromosome 17. C'est un gène d'environ 20 kb constitué de dix (10) introns et onze (11) exons. Les exons 2 à 10 sont codants (**Figure 20**). La protéine p53 est une phosphoprotéine de 393 acides

aminés répartis en trois principaux domaines (Batinac *et al.*, 2003; Harris, 1996).

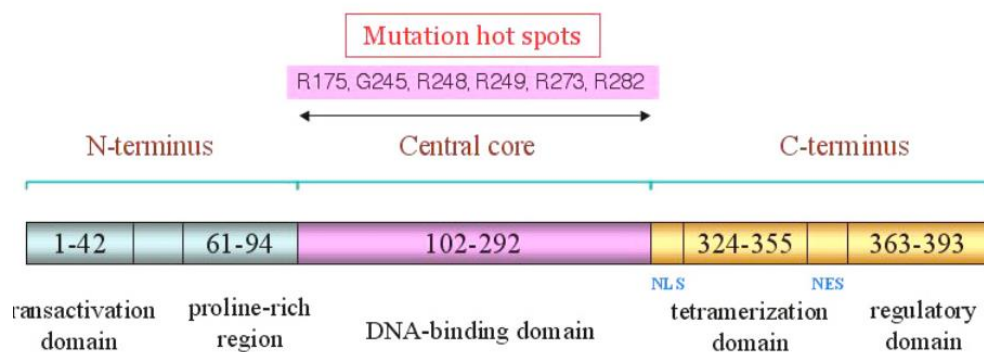


Figure 20: Structure de la protéine p53 (Batinac *et al.* 2003)

Du côté N-terminal de la protéine, se trouve le domaine de transactivation comprenant les acides aminés 1 à 70. Ce domaine interagit avec les facteurs de transcription (p300 et CBP) pour activer la transcription et réguler ainsi les fonctions et la stabilité de la protéine p53. Le deuxième domaine est celui de fixation à l'ADN il va des résidus 94 à 293 et permet à la protéine de se lier aux séquences codant pour les gènes dont il gouverne la transcription. Le domaine de tétramérisation est situé du côté C-terminal de la protéine des résidus 324 à 355, il est indispensable à la formation des tétramères eux-mêmes nécessaires au fonctionnement de la protéine. Les trois domaines précédents sont reliés entre eux par deux régions riches en proline une située du côté N-terminal entre le résidu 71-93 impliquée dans l'induction de l'apoptose et l'autre du côté C-terminal allant des résidus 294 à 324. Le domaine de tétramérisation se termine par une région riche en acides aminés basiques allant des résidus 356 à 393. Cette région est très flexible et régule de nombreuses modifications post-traductionnelles (Silva, Rangel, Costa, Cordeiro et De Moura Gallo, 2013).

L'activité et la concentration intracellulaire des diverses formes de p53 dépendent de modifications imposées après leur synthèse dans deux domaines principaux (A et E), situés aux extrémités de la molécule. La plupart des modifications ont pour effet d'accroître l'activité de la protéine ou sa durée de vie. Les plus importantes consistent à fixer des groupements phosphates sur le domaine A et des groupements acétyles ou des chaînes d'ubiquitine sur le domaine E. Certaines modifications peuvent servir de signal pour imposer d'autres remaniements. Par exemple, la phosphorylation du domaine A renforce l'acétylation, mais inhibe l'ubiquitination du domaine E. La phosphorylation du domaine A est imposée par de diverses kinases telles que CHK2, ATR et CHK1 qui fixent des groupements phosphates. Au niveau du domaine E, on observe plutôt l'interaction des acétylases telles que P300, et diverses ubiquitine ligases. Ces différentes modifications ont pour conséquence de moduler l'action de la p53 (Silva *et al.*, 2013).

En Extrême-Orient, le gène *TP53* est retrouvé muté dans plus de 50% de certaines séries de CHC. En Europe le niveau de mutation se situe aux alentours de 20% des cas. En Afrique noire, on dispose en réalité de très peu de données. La seule étude publiée à ce jour fait état de 35% de mutations. Une petite étude menée dans l'unité « Organisation nucléaire et oncogenèse » en France sur 14 échantillons de CHC de patients d'origine Africaine opérés a permis de mettre en évidence des mutants chez 50% des patients (**n=7/14, A. Marchio, communication personnelle**). Divers sites plus fréquemment mutés ont été identifiés. Ces sites ont été qualifiés de « points chauds » et se situent tous sur le domaine de fixation à l'ADN au niveau des codons 175, 245, 248, 249, 273 et 282 (**Figure 20**). La mutation affectant le codon 249 du gène (R249S) est généralement fréquente dans les régions du globe où on note à la fois une forte endémicité de l'infection par le virus de l'hépatite B et la contamination des aliments tels que les céréales, les oléagineux pour ne citer que ces deux grands groupes par la mycotoxine Aflatoxine B1 (Gouas *et al.*, 2012; Stéphanie Villar *et al.*, 2011).

✓ Les polymorphismes génétiques de *TP53*

Il s'agit de variations dans la séquence nucléotidique trouvées chez plusieurs individus d'une même espèce et se transmettant de façon Mendélienne. Tout d'abord, on distingue des substitutions mononucléotidiques ou SNP (pour « *Single Nucleotide Polymorphism*») qui représentent à elles seules 90% des variants génétiques humains. La plupart sont bi-alléliques et se caractérisent par la fréquence des allèles minoritaires ou allèles variants. On qualifie communément mais abusivement de mutation ponctuelle les SNP dont la fréquence d'allèle mutant est inférieure à 1%. D'autres polymorphismes de l'ADN existent : les insertions, les délétions, les répétitions des microsatellites et les variations du nombre de copies. Plusieurs polymorphismes ont montré leur association à divers cancers c'est le cas par exemple du polymorphisme du gène *TP53* humain au niveau du codon 72 (Bergamaschi *et al.*, 2006; Ørsted, Bojesen, Tybjaerg-Hansen et Nordestgaard, 2007; Sreeja *et al.*, 2008). Ce polymorphisme entraîne une transversion de la guanine en cytosine et le changement d'une arginine en guanine (R72P). De nombreuses études ont été réalisées afin de vérifier l'implication de ce SNP sur le développement des cancers primitifs du foie mais les résultats sont très controversés (S. Hu, Zhao, Yang et Hu, 2013; Lv, Wang, Zhou et Sun, 2013). A notre connaissance, aucune donnée sur le SNP 72 n'est disponible pour les patients atteints de CHC en Afrique Sub-saharienne. On sait cependant, que le polymorphisme fonctionnel du codon 72 est dominé par l'allèle codant pour la proline en Afrique.

✓ L'ADN mitochondrial et haplogroupes mitochondriaux

Les mitochondries sont des organites cellulaires présents dans toutes les cellules eucaryotes excepté les globules rouges et sont impliqués dans la respiration et la production de l'énergie de la cellule. Elles peuvent être représentées en plusieurs centaines de copies dans une cellule humaine. Les mitochondries possèdent leur propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt). Il s'agit d'un ADN circulaire double brin d'environ 16,16 kb. Il comporte 37 gènes dépourvus d'introns. La mitochondrie n'utilise pas les mécanismes de synthèse protéique de sa cellule-hôte, mais possède son propre système de synthèse protéique. L'ADNmt code pour treize polypeptides de la chaîne de phosphorylation oxydative, deux ARN ribosomiques (02) et vingt deux (22) ARN de transfert (**Figure 21**). Toutes les autres protéines de la chaîne respiratoire et celles impliquées dans son assemblage et le maintien de l'ADNmt sont codées par des gènes nucléaires (Anderson *et al.*, 1981).

Le génome mitochondrial est considéré comme haploïde car transmis uniquement par la lignée maternelle et ne subit pas de recombinaison. Ces caractéristiques en font un modèle d'étude de l'évolution des génomes des plus intéressants. Il a été établi que le taux de mutation intrinsèque du génome mitochondrial est beaucoup plus élevé que celui du génome nucléaire avec une valeur de 10 à 200 fois supérieure. Plusieurs facteurs expliquent ce taux de mutation élevé : l'absence de protection de l'ADN par des histones comme c'est le cas pour le génome nucléaire, un mécanisme de correction des erreurs d'incorporation de nucléotides par les polymérases (mécanisme appelé « correction d'épreuve ») dont l'efficacité est moindre que le mécanisme s'exerçant dans le génome nucléaire (Anderson *et al.*, 1981; Greaves, Reeve, Taylor et Turnbull, 2012; Schon, DiMauro et Hirano, 2012).

Le taux de mutation du génome mitochondrial étant élevé, les mutations apparues de manière spontanée chez un individu et affectant la lignée germinale peuvent être transmises à sa descendance, et de nombreux polymorphismes ont été observés sur les quelques 16000 paires de bases qui constituent ce génome. On peut donc caractériser à la fois la variabilité du génome mitochondrial en terme de polymorphisme, mais également la manière dont ces polymorphismes sont combinés entre eux en étudiant les haplotypes (combinaison d'allèles localisés sur différents loci d'un même chromosome) du génome mitochondrial (Hung *et al.*, 2010; H.-C. Lee *et al.*, 2004, 2005; Wallace, 2012).

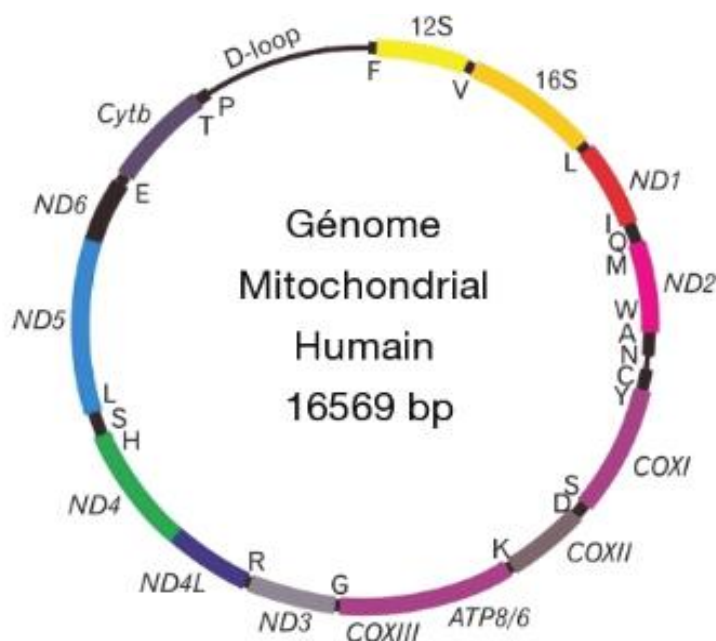


Figure 21: Le génome mitochondrial humain (Taanman 1999).

L'évolution du génome mitochondrial a eu lieu en parallèle de l'expansion des premiers *Homo sapiens* hors d'Afrique. Certaines des mutations acquises sont donc devenues caractéristiques de groupes ethniques existants sur la planète. Ces mutations sont devenues des critères de regroupement des haplotypes mitochondriaux en haplogroupes mitochondriaux (groupe d'ADNmt défini par une combinaison unique de variants mitochondriaux acquis du même ancêtre féminin). Tous les haplotypes mitochondriaux regroupés sous un même haplogroupe sont dérivés du même ancêtre commun. Ces haplogroupes mitochondriaux sont désignés par des lettres de l'alphabet, actuellement toutes utilisées à l'exception de la lettre O. Ainsi, les principaux haplogroupes mitochondriaux observés dans la population européenne sont les haplogroupes H, I, J, K, T, U, V, W, et X. Les haplogroupes asiatiques sont A, B, C, D, F, G, M, Y, et Z. Les haplogroupes africains sont principalement représentés par l'haplogroupe L et ses sous-clades (Ebner *et al.*, 2011; Stewart et Chinnery, 2015).

L'étude des haplogroupes mitochondriaux a permis de les associer en certaines circonstances avec le développement de certains types tumoraux (GUO, YANG, WANG et LIU, 2012; Wang *et al.*, 2011). Ce genre d'étude n'a encore jamais été menée en Afrique noire. L'étude des haplogroupes des patients Camerounais pourrait permettre de définir soit des groupes humains plus susceptibles au développement tumoral soit, plus probablement, des groupes plus exposés à certains facteurs carcinogènes pour des raisons environnementales ou liées au style de vie.

✓ L'insertion de l'ADN adéno-associated virus type 2

Le CHC est un processus multifactoriel qui peut également résulter d'une insertion d'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Des données récentes indiquent que cela pourrait être le

cas de l'insertion de l'ADN du virus associé à l'adénovirus du type 2 (AAV2). L'AAV2 est un parvovirus à ADN linéaire simple brin de 4,7 kb (**Figure 22**) capable d'infecter plus de 80% de la population et d'intégrer son génome dans certains sites préférentiels du génome humain (Janovitz, Sadelain et Falck-Pedersen, 2014).

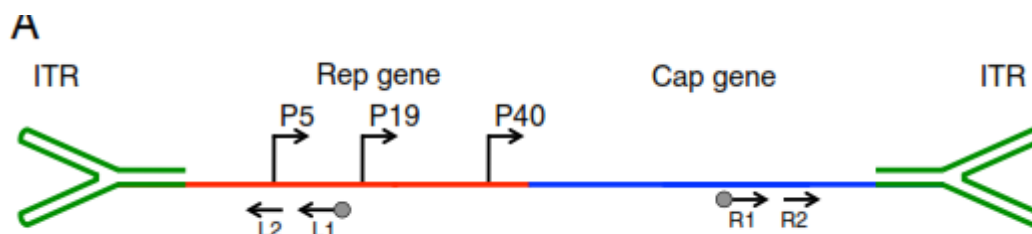


Figure 22: Représentation schématique du génome d'AAV (Janovitz *et al.* 2014)

ITR= Inverted terminal repeats (en vert), en rouge le gène Rep et en bleu le gène Cap ; P5, P19, P40 sont trois promoteurs.

I.3.4 Mécanisme moléculaire de l'hépatocarcinogénèse

Le CHC est un cancer qui met plusieurs décennies à se développer sur un foie qui est généralement soumis à une inflammation chronique voire à une cirrhose (Farazi et DePinho, 2006). L'évolution vers le CHC correspond à un processus à étapes multiples. Les différents facteurs de risque soumettent le foie à des cycles de dommages et de régénérations, favorisant l'apparition de nodules hyperplasiques dont la présence serait due à la fixation des altérations génétiques ou épigénétiques. Ces nodules peuvent évoluer en nodules dysplasiques qui sont des lésions pré-tumorales présentant un éclaircissement des cellules dû à l'accumulation de glycogène ou de lipides, et une multiplication des nucléoles (Aravalli, Steer et Cressman, 2008; Merle et Trepo, 2009). L'architecture du foie devient anormale, et les nodules peuvent acquérir la capacité à envahir les vaisseaux (**Figure 23**).

Cette évolution histologique du foie s'accompagne d'une accumulation d'altérations moléculaires. Ces altérations se font essentiellement au niveau d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs, et permettent l'acquisition des différentes capacités dont ont besoin les cellules cancéreuses pour former des tumeurs. Il est possible d'identifier un ensemble d'altérations un peu plus spécifiques au CHC (Merle et Trepo, 2009).

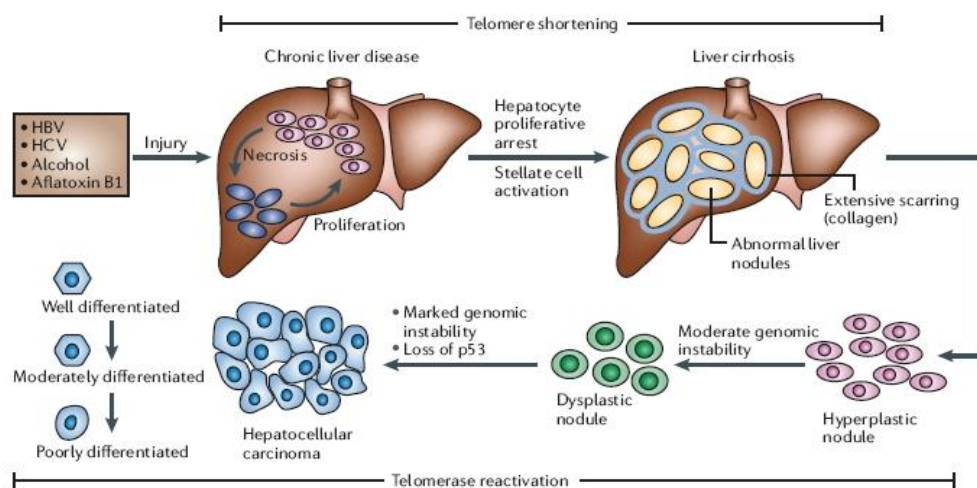


Figure 23: Progression histopathologique du foie vers le CHC. Tiré de (Farazi et DePinho 2006).

L'atteinte la plus caractéristique dans l'hépatocarcinogénèse est une lésion hépatique chronique sous-jacente, ce qui conduit à des cycles répétés de mort des hépatocytes et de prolifération cellulaire compensatrice (la régénération des hépatocytes). Ce processus fournit un environnement mutagène conduisant potentiellement au développement du CHC. La carcinogénèse hépatique est un processus multi-étapes, les hépatites chroniques et la cirrhose étant les étapes prénéoplasiques. En effet, dans la plupart des cas, durant surtout la phase de développement de la cirrhose, des phénomènes d'inflammation et de sénescence répliquative vont entraîner une accumulation d'altérations génétiques qui vont favoriser la sélection d'hépatocytes transformés (Aravalli *et al.*, 2008; Farazi et DePinho, 2006) (**Figure 24**).

Ces altérations génétiques peuvent être divisées en deux groupes. Le premier groupe comprend l'ensemble des modifications génétiques spécifiques liées aux différents facteurs de risque de la tumeur hépatocellulaire; le deuxième groupe est constitué de l'ensemble des altérations génétiques non spécifiquement liées aux étiologies, y compris les gains et les pertes récurrentes de chromosomes, les modifications épigénétiques, les mutations d'oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs dans les carcinomes hépatocellulaires (CHC) (M. Liu *et al.*, 2014; Nishida et Goel, 2011).

La carcinogénèse hépatocellulaire peut se diviser en plusieurs étapes. Les changements moléculaires qui supportent les changements histopathologiques dans le développement des tumeurs peuvent varier d'une tumeur à l'autre. Une diversité de type et du nombre d'altérations génétiques a été observée suivant la localisation géographique et l'étiologie de la tumeur. Dans les zones où l'exposition à l'aflatoxine est élevée, la mutation du troisième nucléotide du codon 249 du gène TP53 est fréquemment rencontrée. Dans tous les cas, la pathologie du CHC

s'accompagne d'une perte de la différenciation cellulaire, de l'adhésion cellulaire, de la matrice extra-cellulaire et d'une activation constitutive du signal de transduction qui permet la prolifération et la survie cellulaire (Gouas *et al.*, 2012; Stéphanie Villar *et al.*, 2011).

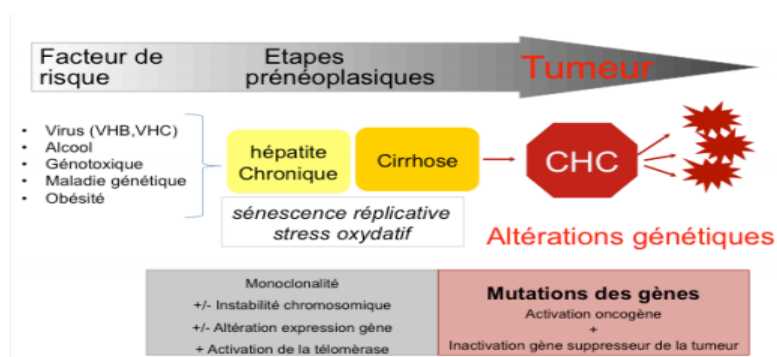


Figure 24: Hépatocarcinogénèse du carcinome hépatocellulaire (Aravalli *et al.* 2008)

Parmi les facteurs moléculaires fréquemment impliqués dans l'apparition d'un CHC, on distingue l'expression des protéines virales responsables de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs c'est le cas par exemple de la protéine HBx du virus de l'hépatite B et le gène TP53 (Ali *et al.*, 2014; Gouas *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2003; Kew, 2011) la protéine NS3 du VHC et TP53 (Feng, Chen, Peng, Zheng et Yan, 1999; Han, Niu, Wang et Li, 2016; Jeong, Jang et Chung, 2012). On a également noté des propriétés transactivatrices comme c'est le cas du gène de capside/core du VHC qui stimule l'expression de *MYC* ainsi que les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs comme TP53 ou *RBI* observés plus tardivement dans la progression tumorale et les sur-expressions des oncogènes comme *MYC* et *CCND1* (Banerjee, Ray et Ray, 2010; Honda *et al.*, 2000; Ma, Shen, Chen et Zhang, 2008; Ray, Lagging, Meyer et Ray, 1996).

L'intégration du génome du VHB dans la cellule hépatique joue également un rôle, notamment en activant la transcription de gènes adjacents au site d'intégration. Les oncoprotéines virales comme HBx, peuvent activer les voies de la transduction de signal par l'intermédiaire de C-JUN et de RAS, activer les oncogènes comme C-MYC, qui sont parallèlement activés par les mutations de la Béta-caténine (Arbuthnot et Kew, 2001; Hai, Tamori et Kawada, 2014; Koike, 1987; Kremsdorf, Soussan, Paterlini-Brechot et Brechot, 2006; Tarocchi, Polvani, Marroncini et Galli, 2014). La Béta-caténine, retrouvée mutée dans les stades précoces de CHC et dans les adénomes de souris transgéniques C-MYC, est une protéine qui participe à l'adhésion cellulaire avec l'E-cadhérine (Ding *et al.*, 2015; L.-J. Liu *et al.*, 2016; Waisberg et Saba, 2015).

D'autres phénomènes comme l'hypo-méthylation ou l'hyper-méthylation de l'ADN entraînent des modifications de l'expression de certains gènes (DONG et WANG, 2014; F. Gao *et*

al., 2015; Udali *et al.*, 2015). Les pertes d'hétérozygotie (Buschmann *et al.*, 2001) en 1p, 4q, 4p, 8p, 13q, 16q, 17p, se retrouvent essentiellement dans les tumeurs non différenciées. Ces pertes d'hétérozygotie affectent souvent des *loci* contenant des gènes suppresseurs, comme TP53 ou RB (13q14). Toutefois, pour de nombreux autres *loci*, la nature des gènes impliqués n'est pas connue avec précision. La fréquence des LOH est associée à un risque de récurrence des tumeurs après ablation chirurgicale (Lévy *et al.*, 2002; M. Liu *et al.*, 2014; Nishida et Goel, 2011).

L'accumulation d'espèces réactives intermédiaires à l'oxygène, observée suite à une réponse inflammatoire liée à l'exposition prolongée à l'AFB1, à une hépatite B ou C chronique, à un alcoolisme, peuvent engendrer des mutations génétiques ponctuelles. D'autres mécanismes comme la régulation positive de la voie des MAP kinases de C-MYC (analyse des tumeurs humaines par micro array) peuvent être responsables de l'instabilité chromosomique observée dans les CHC. Parallèlement, des régulations négatives des facteurs nucléaires des hépatocytes, des facteurs de transcription du foie, du métabolisme des rétinoïdes entraînent une perte de différenciation et de développement cellulaire (Lévy *et al.*, 2002; Nishida et Goel, 2011).

I.3.5 Surveillance, diagnostic et traitement du carcinome hépatocellulaire.

Le diagnostic d'un CHC est généralement fait avec les techniques non invasives telles que l'imagerie médicale (Echographie abdominale) associée au dosage du taux d'alpha-fœtoprotéine sérique (AFP) (Tang, Feng, Guo, Xie et Cai, 2016). Outre les techniques non invasives, le diagnostic du CHC peut également se faire à l'aide des techniques invasives telles que la biopsie et la cytoponction hépatique pour donner plus d'éclaircissement au résultat obtenu lors des techniques d'imagerie médicale. Cependant, les techniques d'imagerie médicale ne peuvent déceler des anomalies hépatiques lorsque la tumeur présente déjà des lésions de taille supérieure à 1 cm de diamètre (Attwa et El-Etreby, 2015b).

Un taux d'AFP supérieur à 400 ng/mL dans le sérum d'un patient atteint de cirrhose ou d'une hépatite chronique est également suffisant pour poser le diagnostic d'un CHC (Wong, Ahmed et Gish, 2015). L'AFP est une glycoprotéine produite à l'origine par le foie du fœtus. Sa production chute après la naissance et est réprimée chez l'adulte. Cependant, plus de 70% des patients atteints de CHC ont une dose d'AFP élevée dans le sang. La concentration en AFP est considérée comme normale lorsqu'elle est inférieure à 20 ng/mL. Ce seuil varie fortement selon les ethnies. Bien que la concentration en AFP dans le sang soit une méthode beaucoup utilisée pour détecter la présence d'un CHC, cet outil est limité (Bruix et Sherman, 2011). En effet, des patients non cancéreux atteints d'une hépatite virale aigüe peuvent présenter une concentration forte en AFP dans le sang, ce qui limite l'utilisation de cette méthode (Attwa et El-Etreby, 2015a).

Le diagnostic d'un CHC est délicat lorsque les lésions sont petites (< 2 cm de diamètre). Les lésions de taille inférieure à 1 cm de diamètre ont un risque de 50% d'être malignes. Dans ce cas, un suivi de la croissance de la lésion est recommandé tous les 3 mois par ultrasonographie, jusqu'à ce que la lésion dépasse 1 cm de diamètre. Lorsque la lésion a un diamètre compris entre 1 et 2 cm, une biopsie est effectuée afin de connaître la nature histologique de la lésion. Cependant, le résultat de l'analyse histologique donne des faux négatifs dans 10 à 20% des cas. De plus, lorsqu'une tumeur est présente, elle peut se propager le long du chemin emprunté par l'aiguille (Attwa et El-Etreby, 2015a).

Même si les patients cirrhotiques, les plus à risque de développer un CHC, sont suivis régulièrement dans les pays développés, le diagnostic reste difficile et tardif. Dans les pays en voie de développement les plus touchés, le suivi est rarement assuré, et les patients sont diagnostiqués très tardivement, après l'apparition de symptômes. Dans ces pays, il manque souvent du matériel d'imagerie et du personnel qualifié. Cependant, parmi toutes les méthodes d'imagerie permettant le diagnostic du CHC, l'ultrasonographie reste la moins chère et donc la plus utilisée (Waghray, Murali et Menon, 2015).

Les options de traitement réduites

Il existe deux grands types de modalités de traitement des patients atteints d'un CHC : les modalités curatives, et lorsque les patients ne peuvent pas en bénéficier, des modalités palliatives (Bruix et Sherman, 2011).

Modalités curatives

La résection chirurgicale peut être effectuée sur un foie ayant conservé de bonnes fonctions hépatiques et porteur d'un CHC unifocal pas trop volumineux (≤ 5 cm de diamètre), sans envahissement vasculaire ou dissémination métastatique. Lorsque ces conditions sont remplies, la survie post résection est bonne : entre 50 et 100% à 5 ans. Chez des patients ne remplissant pas ces conditions, d'autres prises en charges thérapeutiques peuvent être tentées, comme la transplantation hépatique ou les destructions partielles.

La transplantation hépatique est très efficace pour les CHC de petite taille, comme la résection chirurgicale, et peut profiter aux patients cirrhotiques. Les patients qui sont sélectionnés pour la transplantation ont un CHC constitué d'un nodule unique de diamètre $\leq 6,5$ cm, ou de 2-3 nodules de diamètre $\leq 4,5$ cm avec la somme de tous les nodules ≤ 8 cm. Cependant, ce traitement est lourd et coûteux, et la pénurie de greffons rend l'attente longue (Jeng *et al.*, 2014; Waghray *et al.*, 2015).

Les traitements locaux de CHC consistent en la destruction du tissu tumoral par injection d'une substance chimique nécrosante (de l'alcool absolu par exemple) ou par

application d'un moyen physique comme l'hyperthermie par radio fréquences. Ils peuvent être réalisés par voie percutanée sous contrôle échographique ou à ventre ouvert après laparotomie. Les traitements locaux permettent de stériliser des nodules de CHC de petites tailles ($\leq 3-4$ cm de diamètre) mais n'ont aucun intérêt dans les formes métastatiques ou évoluées (Waghay *et al.*, 2015).

Modalités palliatives

Il existe 3 principales modalités palliatives. L'embolisation artérielle hépatique a pour but d'ischémier et de nécroser le tissu tumoral, en utilisant généralement des particules de Spongel. La chimioembolisation lipiodolée artérielle hépatique consiste en l'injection intra-artérielle d'un agent antimitotique et d'un vecteur comme le Lipiodol. L'injection intra-artérielle hépatique de substances radioactives peut avoir un impact anti-tumoral. Ces trois principales modalités palliatives n'ont pas démontré de bénéfice au niveau de la survie des patients même si elles ont un effet anti-tumoral (Lin, Hoffmann et Schemmer, 2012; Singal, Pillai et Tiro, 2014).

Le CHC est un cancer difficilement traitable, et la survie des patients diagnostiqués est faible. En effet, le diagnostic est souvent tardif, ce qui limite fortement l'application de traitements curatifs ainsi que leur efficacité, et donc les chances de survie (Kew, 2013). De plus, la plupart des CHC est diagnostiquée dans des pays en voie de développement qui ne possèdent pas les infrastructures, le personnel et les moyens nécessaires au dépistage et au traitement du CHC. Il semble donc difficile de réduire sensiblement la mortalité par CHC dans ces conditions. Puisqu'il vaut mieux prévenir que guérir, la baisse d'incidence du CHC paraît plus plausible à réaliser en analysant les facteurs de risque qui provoquent ce cancer et en insistant sur la prévention des risques évitables.

I.3.6 CHC au Cameroun : Problématique et objectifs du travail

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer le plus courant en termes d'incidence et de mortalité en Afrique noire et en particulier au Cameroun (Mbakop *et al.*, 1997). Le CHC représente la principale cause de décès par cancers et frappe le plus souvent l'adulte jeune (entre 20 à 40 ans). Son pronostic est fatal, le nombre de cas incident est identique au nombre de décès (Kew, 2013). Forte mortalité due à un diagnostic très tardif ou seules les options de traitements palliatifs sont disponibles. En l'absence de traitement, la survie ne dépasse guère les 5 à 8 mois.

L'Afrique noire est une région de très haute endémicité pour les virus des hépatites B (VHB), C (VHC) et D (VHD) (Kew, 2010; Kramvis et Kew, 2007). A ce jour, peu de données sont disponibles sur cette tumeur en Afrique noire. Au Cameroun, les quelques études descriptives réalisées ont porté essentiellement sur les aspects épidémiologique, clinique et diagnostique de cette tumeur. Aucune étude de type cas témoins n'a été faite sur le CHC en Afrique noire ainsi que les facteurs de risque associés et les mécanismes à l'origine du développement du CHC. Une identification des facteurs de risque virologiques *et* altérations génétiques des cancers primitifs du foie pourrait contribuer à la maîtrise de l'épidémiologie moléculaire du CHC ainsi qu'à la définition de nouveaux biomarqueurs moléculaires et génétiques à utiliser comme outils diagnostiques précoces du CHC.

II. METHODOLOGIE

II.1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude présentant deux grandes parties qui sont: une partie rétrospective et une partie prospective. La partie rétrospective a été menée dans le but d'identifier les différents types et sous types de cancers primitifs du foie tandis que la partie prospective consistait à identifier les facteurs de risque ainsi que les altérations génétiques circulantes associées au développement des cancers primitifs du foie chez les patients Camerounais.

II.2. Sites de recrutement

Les patients inclus dans la partie rétrospective de ce travail ont été recrutés dans le Service d'Anatomie et Pathologie du Centre Pasteur du Cameroun tandis que ceux inclus dans la partie prospective ont été recrutés dans les services de Radiologie, Gastroentérologie, Cardiologie et Infectiologie de l'Hôpital Central de Yaoundé. Cet hôpital reçoit par le système de référence, des patients atteints de maladies hépatiques chroniques identifiés par des médecins généralistes et est impliqué dans la prise en charge thérapeutique des patients infectés par les virus de l'hépatite C (VHC) et B (VHB).

II.3. Populations d'étude

L'étude rétrospective a porté sur l'analyse des données socio-démographiques et de tous les résultats de toutes les biopsies hépatiques disponibles durant la période d'étude (Janvier 2004 à Janvier 2013).

La seconde partie de ce travail était de type prospectif; cette partie a été réalisée de Février 2013 à Décembre 2016 et a porté sur trois groupes de patients constitués des cas et deux types de témoins regroupés en témoins 1 et témoins 2.

- Les cas étaient les patients de tout sexe et tout âge, diagnostiqués d'un cancer primitif du foie (CPF) (Groupe 1).
- Les témoins 1 étaient les patients qui ne présentaient aucun signe clinique d'affection hépatique et qui consultaient pour des affections non hépatiques; ces témoins ont été appariés (1 :1) en sexe et pour l'âge (\pm 5ans) à des cas (Groupe 2).

- Les témoins 2 étaient des patients infectés par le VHB ou le VHC mais sans CPF; ces témoins ont été appariés (1 :1) en sexe et pour l'âge (\pm 5ans) à des cas de mêmes sérologies hépatite B et C. (Groupe 3).

Chaque cas a par la suite été apparié en sexe et en âge plus ou moins 5 ans un témoin.

II.3.1 Critères d'éligibilité et d'inclusion des patients

Ont été inclus comme Cas (Groupe 1) tous, les patients de tout âge et de tout sexe ayant consenti et dont le résultat de l'échographie abdominal présentait un foie d'aspect anormal c'est à dire de taille augmentée et/ou mono ou multi-nodulaire couplé à un taux d'Alpha foetoprotéine sérique (AFP) anormale c'est-à-dire supérieur à 400ng/ml. Parallèlement, les patients dont l'échographie du foie présentait un foie en bon état (sans nodules et de volume normal) ainsi qu'un taux d'AFP normal ($<16,5\text{ng/ml}$) ont été inclus comme témoins.

Deux types de témoins ont été inclus dans la présente étude. Les témoins 1 (Groupe 2) étaient des patients sans CPF et sans aucun signe d'affection hépatique tandis que les témoins 2 étaient des patients sans CPF mais de sérologie hépatite B ou C positive. Tous les appariement étaient faite en sexe et en âge plus ou moins 5 ans.

II.3.2 Critères de non exclusion des patients

Les patients étaient exclus dans les situations suivantes :

- Cirrhose sans cancer primitif du foie
- Tumeurs secondaires hépatiques
- Refus du consentement du patient ou du représentant légal

II.4. Echantillonnage

II.4.1 Type d'échantillonnage

Le recrutement des cas a été fait de façon consécutive. Ainsi, tous les patients qui remplissaient les conditions d'inclusion (cités plus haut) pendant la période de recrutement qui était de Février 2013 à Décembre 2014 ont été automatiquement enrôlés après l'obtention de leur consentement éclairé ou de l'assentiment dans le cas des patients mineurs.

II.4.2 Taille d'échantillon

La taille minimale des échantillons à inclure a été estimée à l'aide de la formule de Lorenz suivante :

$N = PQ(Z\alpha)^2/D^2$ avec N = Taille de l'échantillon, P = Prévalence, Q = 1-P, $Z\alpha$ = Ratio critique du seuil de significativité ; Pour un taux de confiance de 95%, $Z\alpha$ = 1,96 et D = Erreur sur la mesure acceptable (5%).

La prévalence nationale de l'hépatite virale B au Cameroun est de 11% ; et par le pourcentage de survenu du CHC chez les patients infectés par le virus de l'hépatite B est compris entre 30% et 50% mais ici nous avons considéré 30%.

$N = 0,3 \times 0,11 \times (1-0,11) \times (1,96/0,05)^2 = 41,49$. Donc une taille minale d'environ 42 était requise pour cette étude.

Nous avons procédé à un dénombrement complet des patients souffrant d'un CPF durant la période impartie au recrutement.

II.5 Questionnaire

Après avoir obtenu le consentement des différents participants, ces derniers ont été soumis à une série de questions standards (**Annexe 1**). Ce questionnaire a permis de recueillir les données sociodémographiques, les facteurs de risque d'infection par les virus hépatiques, les facteurs associés au développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) ainsi que les habitudes alimentaires pouvant servir à l'estimation de l'exposition aux mycotoxines.

II.6 Consideration éthique

Le protocole de cette étude avait été conçu conformément aux recommandations internationales en termes d'études cliniques (La déclaration d'Helsinki, les recommandations des bonnes pratiques cliniques). Le protocole de l'étude, la fiche de consentement éclairé, les différents formulaires d'inclusion et de suivi des patients avaient été soumis et validés par le Comité National d'Ethique et le Ministère de la Santé Publique du Cameroun (**Annexes 2**). Cette étude avait également reçu une autorisation administrative (**Annexe 3**). Seuls les patients ayant consenti ont été inclus dans cette étude. Tous avaient bénéficié d'une information orale éclairée et précise sur les objectifs de l'étude et les modalités pratiques. Les différents résultats obtenus ont été rendus, la confidentialité des données et des informations ont été strictement respectée.

II.7 Prélèvements

Les prélèvements de sang ont été faits dans des tubes secs pour le dosage des marqueurs sériques, les tubes à EDTA pour la réalisation des différents tests de biologie moléculaire et hématologie. Les plasmas et séra obtenus, après centrifugation pendant 10 minutes à 2500 tours/minute ont été aliquotés puis conservés à -80°C pour des analyses ultérieures.

II.8 Les tests sérologiques

II.8.1 Sérologie hépatite C

La sérologie du VHC a été évaluée par la détection des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (Anti-VHC) en utilisant le kit commercial dénommé «Monolisa™ Anti-HCV PLUS Version 2 » suivant les instructions du fabricant (Monolisa anti-HCV Plus version 2; Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France).

Principe du test

Le test Monolisa™ Anti-HCV PLUS Version 2 est un test immuno-enzymatique indirect utilisé pour la détection des anticorps témoignant l'infection par le virus de l'hépatite C dans le sérum ou dans le plasma. C'est un ELISA qui utilise une phase solide préparée avec trois protéines recombinantes produites par *Escherichia coli* à partir des clones sélectionnés dans les régions non structurales (NS3 et NS4) et structurales du génome du virus de l'hépatite C. La phase mobile utilisée ici est constituée d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline G (anti-IgG) humains purifiés par chromatographie d'affinité et couplés à la peroxydase. Après arrêt de la réaction par ajout de l'acide sulfurique dans chaque puits, on procède par la suite à la révélation du complexe anticorps-antigène. Ce complexe est formé après l'action de la peroxydase sur le réactif chromogène par la mesure des densités optiques entre les longueurs d'ondes comprises entre 450-620 nm. Dans ce test, l'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-VHC fixée sur la phase solide.

Mode opératoire

Le dosage des anticorps anti-VHC a été réalisé suivant les recommandations du fabricant (Monolisa anti-HCV Plus version 2; Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France). Brièvement, les échantillons et les différents contrôles (positif et négatif) ont été dilués et incubés en présence du traceur enzymatique. Après incubation, la plaque a été lavée et

incubée en présence de la solution de substrat. L'absorbance du mélange obtenu a été mesurée entre les longueurs d'ondes de 450nm et 620 nm.

Calcul des résultats

La valeur seuil a été déterminée suivant les recommandations du fabricant. Cette valeur a été calculée en divisant la moyenne des contrôles positifs et négatifs par cinq (5) (formule 1). Le ratio a par la suite été déterminé en divisant l'absorbance de chaque échantillon avec la valeur seuil trouvée.

Formule 1 : $V_s = (\text{Moyenne des contrôles positifs} + \text{Moyenne des contrôles négatifs})/5$

II.8.2 Sérologie hépatite B

Dans la présente étude, la sérologie du VHB a été évaluée par détection des antigènes de surface du VHB, des anticorps totaux dirigés contre les antigènes de surface de ce virus (Anti-HBs), des anticorps dirigés contre l'antigène core du virus de l'hépatite B (anti-HBc) et les antigènes e du virus de l'hépatite B (AgHBe).

II.8.2.1 Détection des antigènes de surface du VHB

Dans la présente étude, les antigènes de surface du VHB ont été identifiés en utilisant le kit commercial dénommé «Murex AgHBs Version 3 » suivant les instructions et les recommandations du fabricant (Murex AgHBs version 3; DiaSorin, SPA UK BRANCH).

Principe du test

Dans le test Murex HBsAg Version 3, l'échantillon est pré-incubé dans les cupules recouvertes d'un mélange d'anticorps monoclonaux de souris spécifiques de différents épitopes du déterminant "a" de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (AgHBs). Des anticorps de chèvre purifiés par chromatographie d'affinité dirigés contre l'AgHBs conjugués à la peroxydase de raifort sont alors ajoutés à l'échantillon contenu dans la cupule. Lors des deux étapes d'incubation, tous les AgHBs présents dans l'échantillon forment des complexes anticorps-antigènes-anticorps-enzymes dans la cupule. S'il n'y a pas d'AgHBs dans l'échantillon, le conjugué ne sera pas lié. Après lavage (Pour éliminer l'échantillon et le conjugué non lié), une solution contenant du tétraméthylbenzidine (TMB) et de l'eau oxygénée est ajoutée dans les cupules. Les cupules contenant de l'AgHBs et donc, du conjugué lié, développent une couleur violette qui vire à l'orange lorsque la réaction enzymatique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 5N.

Mode opératoire

Le dosage des AgHBs a été réalisé suivant les recommandations du fabricant (Murex AgHBs version 3; DiaSorin, SPA UK BRANCH). Brièvement, les échantillons et les différents contrôles (positif et négatif) ont été dilués et incubés en présence du traceur enzymatique. Après incubation à 37°C, la plaque a été lavée et incubée à nouveau en présence de la solution de substrat. L'absorbance du mélange obtenue a été mesurée entre 450nm et 620 nm après arrêt de la réaction par la solution d'acide sulfurique 5N.

Calcul des résultats

La valeur seuil a été déterminée par ajout du facteur 0,05 à la moyenne des contrôles négatifs.

$$V_s = (\text{Moyenne des contrôles Négatifs} + 0,05)$$

Interprétation des résultats

La présence ou l'absence d'AgHBs a été déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil obtenue. Ont été classés positifs les échantillons fournissant une densité optique supérieure ou égale à la valeur seuil et négatifs tous les échantillons fournissant une densité optique inférieure à la valeur seuil.

II.8.2.2 Détection des anticorps totaux qui sont dirigés contre les antigènes de surface du virus de l'hépatite B (anti-HBs)

Les anticorps totaux dirigés contre les antigènes de surface du VHB ont été évalués en utilisant le kit commercial dénommé « Monolisa anti-HBs PLUS » suivant les instructions du fabricant (Monolisa anti-HBs PLUS; Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

Principe du test

Monolisa™ Anti-HBs PLUS est un test immuno-enzymatique utilisé pour la détection qualitative et quantitative des anticorps totaux qui sont dirigés contre les antigènes de surface du virus de l'hépatite B dans le sérum ou le plasma humain. C'est un ELISA direct qui utilise deux types d'antigènes l'un fixé à la phase solide et l'autre couplé à la peroxydase. Après arrêt de la réaction, le complexe antigène-anticorps formé est révélé par lecture des densités optiques entre 450-620 nm du produit coloré soluble formé après l'action de la peroxydase sur le réactif chromogène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité

d'anticorps anti-HBs présent dans l'échantillon. Les valeurs des densités optiques des patients sont comparées à la valeur seuil déterminée à l'aide du calibrateur 10mUI/mL.

Mode opératoire

Le dosage a été fait suivant les recommandations du fabricant (Monolisa anti-HBs PLUS; Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Brièvement, les échantillons et les différents contrôles (positif et négatif) ont été dilués et incubés en présence du traceur enzymatique. Après incubation à 37°C, la plaque a été lavée puis incubée en présence de la solution de substrat. L'absorbance du mélange obtenu a été mesurée entre 450 et 620 nm.

Calcul des résultats

La valeur seuil de la réaction a été déterminée par le calcul de la moyenne de l'absorbance du calibrateur 10 mIU par millilitre suivant la formule ci-après.

$$V_s = \text{Moyenne de l'absorbance fournie par le calibrateur de 10 mUI par ml}$$

Interprétation des résultats

La présence ou l'absence d'Anti-HBs a été déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil obtenue. Ont été classés positifs les échantillons fournissant une densité optique supérieure ou égale à la valeur seuil et négatifs tous les échantillons fournissant une densité optique inférieure à la valeur seuil.

II.8.2.3 Détection des anticorps totaux dirigés contre l'antigène core du virus de l'hépatite B (Anti-HBc)

Les anticorps totaux dirigés contre l'antigène core du VHB ont été évalués en utilisant le kit commercial dénommé « Monolisa anti-HBc PLUS » suivant les instructions du fabricant (Monolisa anti-HBs PLUS; Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

Principe du test

Le test MonolisaTM Anti-HBc PLUS est un test immuno-enzymatique destiné à la détection simultanée des anticorps totaux dirigés contre l'antigène core du virus de l'hépatite B (Anti-HBc) dans le sérum ou le plasma humain. C'est un ELISA indirect qui utilise une phase solide qui contient les antigènes recombinants de la capsidre couplés à la peroxydase. Une phase mobile constituée d'anticorps immunoglobulines G (IgG) et M (IgM) humains purifiés par chromatographie d'affinité et couplés à la peroxydase est également ajoutée. Le

conjugué non lié est éliminé par lavage avec une solution contenant de la tétraméthylbenzidine (TMB) ajoutée dans les cupules. Après arrêt de la réaction enzymatique par de l'acide sulfurique 5N, le complexe antigène-anticorps formé a été révélé par lecture des densités optiques entre 450-620 nm. La coloration violette des échantillons non réactifs vire à l'incolore tandis que pour les échantillons réactifs, on note un changement de coloration du bleu au jaune. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-HBc présent dans l'échantillon.

Mode opératoire

Le dosage a été fait suivant les recommandations du fabricant (Monolisa anti-HBs PLUS; Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Brièvement, les échantillons et les différents contrôles (positif et négatif) ont été dilués et incubés en présence du traceur enzymatique. Après incubation, la plaque a été lavée et incubée en présence de la solution de substrat. L'absorbance du mélange obtenu a été mesurée entre 450 et 620 nm.

Calcul des résultats

La valeur seuil de la réaction a été calculée par la division par 5 de la moyenne de l'absorbance des contrôles positifs divisée.

$$V_s = (\text{Moyenne de l'absorbance fournie par les contrôles négatifs})/5$$

Interprétation des résultats

La présence ou l'absence d'Anti-HBc a été déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil obtenue. Ont été classés positifs les échantillons fournissant une densité optique supérieure à la valeur seuil et négatifs tous les échantillons fournissant une densité optique inférieure à la valeur seuil.

II.8.2.4 Détection des antigènes e du virus de l'hépatite B (AgHBe)

Les antigènes e du VHB ont été détectés en utilisant le kit commercial dénommé « Monolisa AgHBe PLUS » suivant les instructions du fabricant (Monolisa AgHBe PLUS; Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

Principe du test

MonolisaTM HBeAg PLUS est un test immuno-enzymatique utilisé pour la détection qualitative de l'antigène HBe du virus de l'hépatite B dans le sérum ou le plasma humain. C'est un ELISA qui utilise trois anticorps, un anticorps anti-HBe humain et deux anticorps

monoclonaux couplés à la peroxydase. Après arrêt de la réaction, le complexe anticorps-antigène formé est révélé par lecture des densités optiques entre 450-620 nm du produit coloré soluble formé après l'action de la peroxydase sur le réactif chromogène.

Mode opératoire

Le dosage a été fait suivant les recommandations du fabricant (Monolisa AgHBe PLUS; Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Brièvement, les échantillons et les différents contrôles (positif et négatif) ont été dilués et incubés en présence du traceur enzymatique. Après incubation, la plaque a été lavée et incubée en présence de la solution de substrat. L'absorbance du mélange obtenu a été mesurée entre 450 et 620 nm.

Calcul des résultats

La valeur seuil a été déterminée par jout du facteur 0,00255 à la moyenne des contrôles négatifs. Le ratio a par la suite été déterminé en divisant l'absorbance de chaque échantillon par la valeur seuil trouvée.

$$V_s = (\text{Moyenne des contrôles Négatifs} + 0,0025)$$

Interprétation des résultats

La présence ou l'absence de l'antigène e a été déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil obtenue. Ont été classés positifs les échantillons dont le ratio était supérieur ou égal à 1 et négatifs tous les échantillons donc le ratio était inférieur à 1.

II.8.3 Sérologie hépatite Delta ou D

La sérologie du virus de l'hépatite Delta (VHD) a été évaluée par la détection des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite D (Anti-VHD) en utilisant le kit commercial dénommé «ETI-AB-DELTAK-2 » suivant les instructions du fabricant.

Principe du test

Le kit ETI-AB-DELTAK-2 est un test immuno-enzymatique qualitatif utilisé pour la détection des anticorps anti-HD du virus de l'hépatite D dans le sérum ou dans le plasma.

C'est un ELISA compétitif donc la phase solide est revêtue d'antigènes HD recombinants et des immunoglobulines G (IgG) humains. Les anticorps anti-HD présents dans l'échantillon entrent en compétition avec les anticorps anti-HD humains conjugués à la peroxydase vis-à-vis d'une quantité fixe et connue d'antigènes HD liés à la phase solide. L'activité enzymatique est inversement proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-HD présente dans l'échantillon. Après arrêt de la réaction, la mesure de l'activité enzymatique s'effectue après addition de la solution chromogène/substrat qui, sous l'action de l'enzyme, donne une coloration détectable par la lecture des densités optiques entre 450-630 nm. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-VHD présents dans l'échantillon.

Mode opératoire

Le dosage a été fait suivant les recommandations du fabricant «ETI-AB-DELTAK-2 ». Brièvement, les échantillons et les différents contrôles (positif et négatif) ont été dilués et incubés en présence du traceur enzymatique. Après incubation, la plaque a été lavée et incubée en présence de la solution de substrat. L'absorbance du mélange obtenu a enfin été mesurée entre 450 et 620 nm.

Calcul des résultats

La valeur seuil a été déterminée suivant cette équation:

$$V_s = 0,5x (\text{Moyenne des contrôles positifs} + \text{Moyenne des contrôles négatifs})$$

Interprétation des résultats

La présence ou l'absence d'anticorps anti-HD a été déterminée en comparant la valeur de l'absorbance des échantillons avec la valeur seuil. Les échantillons ayant présenté une absorbance inférieure ou égale à la valeur seuil ont été classés positifs tandis que ceux présentant une absorbance supérieure à celle de la valeur seuil ont été classés positifs.

II.8.4 Sérologie hépatite E

Les marqueurs sérologiques d'infections par le virus de l'hépatite E ont été analysés par dosage des immunoglobulines G et M en se servant du kit commercial du fabricant MP DIAGNOSTIC.

Principe du test

Il s'agit d'une technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) qualitative de type sandwich, réalisée sur du sérum ou le plasma humain. Les antigènes du VHE coâtés dans la plaque étant des peptides de synthèse qui sont dérivés des souches prototypes codés par le cadre de lecture ouvert 2 (ORF2). Cette portion du gène est hautement conservée.

Mode opératoire du test

Brièvement, les séra ou les plasmas ont été dilués au 10^e à l'aide du diluent fournit dans le kit puis incubés à 60±5 min à 37°C. Après incubation, la plaque cotée a été lavée tel que décrit par le fabricant. Un total de 100µL du conjugué (anticorps polyclonal anti-IgG ou anti-IgM marqué à la peroxydase) a été ajouté dans chaque puits et la plaque a été incubée. Après incubation on a procédé au deuxième cycle de lavage et adsorption. Un volume de 100µL d'une solution substrat contenant de la tétra-méthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène a été ajouté dans la plaque. Cette dernière a été incubée à température ambiante (20-25°C) pendant 30 min. A la fin de l'incubation, la réaction a été stoppée par ajout dans chaque puits 50µL d'une solution d'acide sulfurique 5N. Les densités optiques ont été lues entre 450-630nm.

Calcul des résultats

La valeur seuil pour la détection des IgM a été déterminée en additionnant à la somme des moyennes des contrôles négatifs une valeur de 0,400 tandis que celle des IgG a été déterminée en ajoutant à la moyenne des contrôles négatifs une valeur de 0,500.

Interprétation des résultats

Les résultats ont été exprimés en DO/valeur seuil et ont été qualifiés positifs les échantillons avec un rapport >1 pour les IgG et IgM et négatifs ceux pour lesquels le rapport était <1 pour les deux marqueurs.

II.9 Les tests de biologie moléculaire

II.9.1 Détermination quantitative de l'ARN du VHC

L'ARN du VHC a été extrait puis quantifié dans les échantillons positifs en sérologie VHC en utilisant le kit commercial dénommé «Abbott RealTime HCV » du fabricant (Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL 60018 USA). Ce kit permet de faire une extraction automatisée de l'ARN du VHC dans le sérum ou le plasma des patients à l'aide du système « Abbott

*m2000sp*TM Sample preparation ». Les acides nucléiques obtenus sont par la suite amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) temps réel, utilisant les amorces qui ciblent la région 5'UTR du VHC.

II.9.1.1 Extraction de l'ARN du VHC

Le système d'extraction « Abbott *m2000sp*TM Sample preparation » utilise la technologie des particules magnétiques afin de capturer les acides nucléiques contenus dans l'échantillon. Les particules virales du VHC sont lysées par un tampon permettant la libération des acides nucléiques qui se fixent sur les billes magnétiques entourées de silicate. Le système est composé d'un aimant qui permet l'accrochage des acides nucléiques. Les particules sont lavées afin d'éliminer tout composant de l'échantillon non lié. Les acides nucléiques liés sont élués et transférés vers les tubes de sortie ou vers une plaque de 96 puits profonds en utilisant un tampon d'éluion. Ces acides nucléiques sont prêts pour l'amplification.

II.9.1.2 Quantification de l'ARN du VHC

II.9.1.2.1 Principe de la méthode

Le système de dosage Abbott *m2000rt*TM est entièrement automatisé pour l'amplification et la détection d'acides nucléiques. Il applique la technologie d'amplification des signaux qui utilise les sondes présentant deux fluorophores (un à l'extrémité 5' de la sonde et l'autre à l'extrémité 3' de la sonde). Au cours de l'amplification, l'activité 5' exonucléasique de la Taq DNA polymérase dégrade la sonde dans la direction (5'→3'). Le fluorophore donneur sera dégagé de l'action de l'extincteur et émettra un signal fluorescent mesurable par l'instrument. Le suivi en temps réel de la fluorescence accumulée permet la quantification du produit de PCR. Le cycle d'amplification au cours duquel le signal fluorescent est détecté par le *m2000rt*TM est proportionnel au logarithme de la concentration d'ARN présente dans l'échantillon d'origine. Les résultats sont rendus en unités internationales par millilitre (UI/mL).

II.9.1.2.2 Amplification de l'ARN du VHC par PCR temps réel

Le système de dosage Abbott *m2000rt*TM utilise la RT-PCR afin de générer ADNc grâce à l'activité reverse transcriptase de la polymérase thermostable. Une séquence d'ARN

non liée à la séquence cible de VHC est introduite dans chaque échantillon au début de la préparation des échantillons et sert de contrôle interne. En premier lieu, les amorces de transcription inverse du VHC et du contrôle interne s'hybrident avec leurs cibles respectives et s'étendent au cours d'une période d'incubation prolongée. Suite à l'étape de dénaturation, au cours de laquelle la température de la réaction s'élève au-dessus du point de fusion du produit d'ADNc double brin, une deuxième amorce s'hybride avec le brin d'ADNc et s'étend sous l'activité de l'ADN polymérase afin de créer un produit ADN double brin. Pendant chaque cycle de thermocyclage, les produits d'amplification se dissocient en brins simples sous l'effet de la température élevée, l'amorce s'hybride et s'étend lors de la baisse de température. L'amplification exponentielle est réalisée grâce aux cycles répétés entre températures élevées et basses. Les deux cibles (ARN du VHC et contrôle interne) sont amplifiées simultanément au cours de la même réaction. La quantité de séquences cibles du VHC présente à chaque cycle d'amplification est mesurée à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence sur l'appareil d'amplification. La séquence ciblée se situe sur la région 5'UTR du VHC.

II.9.1.2.3 Détection et interprétation des résultats

La présence des produits d'amplification a été détectée au cours de l'étape d'extension/liaison en mesurant la fluorescence de la sonde du contrôle interne de même que celle de la sonde du VHC. Le test n'a été validé que lors d'une détection simultanée des deux produits amplifiés dans chaque cycle. La concentration en ARN viral du VHC des échantillons et des contrôles positifs et négatifs ont été automatiquement rapportées. Les résultats du dosage sont rendus en UI/mL ou en logarithme de 10 (log UI/ml). La valeur seuil du était de 13 UI/ml. Ont été classés indétectables tous les échantillons qui ont fournis une charge virale inférieure à la valeur seuil de la technique.

II.9.2 Détermination quantitative de l'ADN du VHB

L'ADN du VHB a été extrait puis quantifié dans les échantillons confirmés AgHBs positifs par le test immuno-enzymatique en utilisant le kit commercial dénommé «Abbott RealTime HBV » du fabricant (Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL 60018 USA). Ce kit a permis de faire une extraction automatisée de l'ADN du VHB dans le sérum ou le plasma des patients à l'aide du système « Abbott *m2000sp*TM Sample preparation ». Les acides nucléiques obtenus sont par la suite amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) temps réel utilisant les amorces qui ciblent le gène S du VHB.

II.9.2.1 Extraction automatisée par le système « Abbott m2000spTM Sample preparation ».

L'extraction de l'ADN viral a été effectuée à partir des plasmas infectés par le VHB et confirmés positifs en sérologie. Le but de l'extraction est d'obtenir des acides nucléiques plus ou moins purs et concentrés. Le système d'extraction « Abbott m2000spTM Sample preparation » utilise la technologie des microparticules magnétiques afin de capturer les acides nucléiques contenus dans l'échantillon. Les particules virales du VHB sont lysées par un tampon et la protéinase K permettant la libération des acides nucléiques qui se fixent sur les billes magnétiques entourées de silicate. Le système est composé d'un aimant qui permet l'accrochage des acides nucléiques. Les particules sont lavées afin d'éliminer tout composant de l'échantillon non lié. Les acides nucléiques liés sont élués et transférés vers les tubes de sortie ou vers une plaque de 96 puits profonds en utilisant un tampon d'éluion. Ces acides nucléiques sont prêts pour l'amplification.

II.9.2.2 Détermination quantitative de l'ADN du VHB

II.9.2.2.1 Principe de la méthode

Le système de dosage Abbott m2000rtTM est entièrement automatisé pour l'amplification et la détection d'acides nucléiques. Il applique la technologie d'amplification des signaux utilisant les sondes présentant deux fluorophores (un à l'extrémité 5' de la sonde et l'autre à l'extrémité 3' de la sonde). Au cours de l'amplification, l'activité 5' exonucléasique de la Taq DNA polymérase dégrade la sonde dans la direction (5'→3'). Le fluorophore donneur sera dégagé de l'action de l'extincteur et émettra un signal fluorescent mesurable par l'instrument. Le suivi en temps réel de la fluorescence accumulée permet la quantification du produit PCR. Le cycle d'amplification au cours duquel le signal fluorescent est détecté par le m2000rtTM est inversement proportionnel au logarithme de la concentration d'ADN présente dans l'échantillon d'origine. Les résultats sont rendus en unités internationales par millilitre (UI/mL).

II.9.2.2.2 Amplification de l'ADN du VHB par PCR temps réel

Le système de dosage Abbott m2000rtTM utilise l'enzyme Amplitaq Gold en présence des désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) et du magnésium lors de l'amplification. Lors de l'extraction, une séquence d'ADN non liée à la séquence cible de VHB a été introduite dans chaque échantillon et a servi de contrôle interne. En premier lieu, les amorces du VHB

et du contrôle interne ont été hybridées avec leurs cibles respectives et ont été étendues par la polymérase. Après une étape de dénaturation au cours de laquelle la température a été augmentée au-delà du point de fusion du produit d'ADN double brin, le nouveau brin d'ADN créé a été dénaturé de l'ADN cible. Pendant chaque cycle de thermocyclage, les produits d'amplification se dissocient en brins simples sous l'effet de la température élevée, l'amorce s'hybridant et s'étendant lors de la baisse de température. L'amplification exponentielle a été atteinte en répétant ces cycles d'augmentation et de diminution de la température. Les deux cibles (ADN du VHB et contrôle interne) ont été amplifiées simultanément au cours de la même réaction. La quantité de séquences cibles de VHB présente à chaque cycle d'amplification a été mesurée à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence sur l'appareil d'amplification. La séquence d'intérêt de la technique se situe sur le gène de surface du VHB.

II.9.2.2.3 Détection et interprétation des résultats

La présence des produits d'amplification a été détectée au cours de l'étape d'extension/liaison en mesurant la fluorescence de la sonde du contrôle interne de même que celle de la sonde du VHB. Le test n'a été valide que lors d'une détection simultanée des deux produits amplifiés dans chaque cycle. La concentration en ADN viral du VHB des échantillons et des contrôles positifs et négatifs était automatiquement rapportée. Les résultats du dosage ont été rendus en UI/mL ou en logarithme de 10 UI/mL (log UI/mL). La valeur seuil du test était de 10 UI/ml. Ont été classés indétectables tous les échantillons qui fournissaient une charge virale inférieure à la valeur seuil.

II.9.3 Génotypage du VHC

Les différents génotypes et sous génotypes (sous types) du VHC ont été déterminés chez les patients dont la charge virale avait été détectée. Les génotypes et sous types ont été déterminés par amplification, séquençage et analyse phylogénétique des 382 et 400 nucléotides des régions NS5B et Capside respectivement.

II.9.3.1 Amplification de la région NS5B du VHC

II.9.3.1.1 Extraction de l'ARN du VHC

L'ARN viral du virus du VHC a été extrait dans 140 µL de plasma avec le kit dénommé QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant.

Principe de l'extraction

L'extraction et la purification de l'ARN par le kit «Qiagen» se fait à travers de petites colonnes de silice adaptées à des tubes de 1,5 à 2 ml. Les particules virales du VHC sont lysées en présence du tampon de lyse (AVL) après une incubation de 10 minutes à température ambiante. Cette méthode repose sur la rétention spécifique de l'ARN par chromatographie d'échange d'ions à travers une phase stationnaire solide constituée d'une membrane faite à base de la silice. Pendant la centrifugation, l'ARN se fixe sur la colonne et les contaminants sont efficacement lavés en utilisant deux tampons de lavage différents (AW1 et AW2). L'ARN de haute pureté est élué avec de l'eau RNase/DNase free. L'ARN obtenu est prêt pour amplification directe ou stocké à -20°C pour une amplification ultérieure.

Procédure du test

Dans des tubes Eppendorf stériles bien identifiés, ont été déposés successivement: 140 µL de plasma, 5600 µL de la solution tampon de lyse (AVL). Le mélange a été homogénéisé par vortex pendant 15 secondes puis centrifugé brièvement à 6000g pendant 30 secondes. Les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 10 minutes. Après incubation, 560 µl de la solution d'éthanol absolue ont été ajoutés au mélange. Ce mélange a par la suite été transféré dans les colonnes puis centrifugé à 6000g pendant 1 minute afin de permettre l'adsorption des acides nucléiques sur le filtre inséré dans la colonne. L'excédant non fixé a été lavé à l'aide des tampons de lavage AW1 et AW2. L'éluant qui constitue notre matériel d'intérêt a été récupéré par centrifugation à 6000g des colonnes après ajout de la solution eau RNase/DNase free. Les acides nucléiques purifiés obtenus ont été conservés à -80°C pour les analyses ultérieures.

II.9.3.1.2 Amplification de l'ARN du VHC par PCR

L'amplification du gène NS5B de l'ARN du VHC a été faite en deux étapes à savoir: Une RT-PCR « Touch Down » et une PCR sémi-nichée suivant la méthode décrite par (Pasquier *et al.*, 2005).

Principe de la RT-PCR « Touch Down »

La technique de RT-PCR « Touch Down » repose sur l'amplification spécifique d'une séquence nucléotidique après l'étape de transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Cette amplification se fait par réduction progressive de la température d'hybridation par cycle de façon à retrouver la température d'hybridation de

l'autre amorce. Ceci dans le but de favoriser l'hybridation de deux amorces qui ont des températures de fusion (T_m) différentes.

Principe de la PCR Nichée et sémi-nichée

La technique de PCR nichée repose sur l'amplification spécifique d'une séquence nucléotidique à travers deux PCR successives. Elle consiste concrètement en la réalisation d'une première PCR puis d'une seconde PCR en utilisant les produits de la première PCR, ceci dans le but d'augmenter la spécificité et la sensibilité de l'amplification. Si au cours de la deuxième PCR l'amorce sens est conservée, la PCR sera qualifiée de sémi-nichée. Dans le cas où les deux amorces sont changées, la PCR est dite nichée.

Mode opératoire

L'ARN du VHC a été amplifié au niveau de la région NS5B par la technique de PCR sémi-nichée suivant le protocole décrit par (Njouom *et al.*, 2012). Les amorces SO755 (5'-TATGAYACCCGCTGYTTTGCTC-3') et ASO 1121 (5'-GCNGARTAYCTVGTCATAGCCTC-3') ont été utilisées lors de la première PCR tandis que les amorces SO755 et ENO2BIS (5'-GCTAGTCATAGCCTCCGT-3') ont été utilisées au cours de la seconde PCR. Brièvement, 10 μ L d'ARN ont été ajoutés à 40 μ L de PCR Mix contenant : 7,2 μ L d'eau RNase/DNase free, 25 μ L de tampon 2X, 1,5 μ L de dNTPs 10 mM, 1 μ L de l'amorce SO 755 200 nM et ASO 1121 200nM, 2,3 μ L de $MgSO_4$ 50 mM, 1 μ L de RNAsin et 1 μ L de RT-Taq polymérase (1UI/ μ L). Le mélange réactionnel d'un volume de 50 μ L a été placé dans un thermocycleur préprogrammé à 50°C pendant 30 minutes suivi de 5 cycles de PCR à 93°C pendant 30 secondes; 60 °C pendant 45 secondes et 72 °C pendant 1 minutes) suivi immédiatement de 35 cycles à 93°C pendant 30 secondes, 60°C avec une baisse de la température de -0,3°C par cycle puis 72°C pendant 1 minute et une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes. Le mélange a été chauffé à 93°C afin de dénaturer l'acide nucléique et d'exposer les séquences cibles de l'amorce. Le mélange a été refroidit à 60°C afin de favoriser l'hybridation spécifique de l'amorce sens et anti-sens au brin d'ADN. L'opération a été répété à un nombre défini de cycles, chaque cycle doublant la quantité d'amplicons d'ADN.

Dans le but d'optimiser la sensibilité et la spécificité de la réaction, une PCR sémi-nichée a été réalisée avec 2 μ L des produits précédemment obtenus à l'aide des amorces SO 755 et ENO2BIS. Tour à tour, 2 μ L d'amplicon ont été ajoutés à 48 μ L de PCR Mix contenant

: 36,25 µL d'eau RNase/DNase free, 5 µL de tampon 10X, 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de l'amorce SO 755 200 nM et ENOBIS 200 nM, 3,5 µL de MgCl₂ 50 mM, et 0,25 µL de Taq polymérase (5UI/µL). Le mélange réactionnel d'un volume de 50µL a été placé dans un thermocycleur préprogrammé à 95°C pendant 5 minutes suivi de 35 cycles de PCR à 95°C pendant 30 secondes; 55 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 30 secondes) et une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

II.9.3.2 Amplification de la région Capside du VHC

Après l'extraction à l'aide du kit « QIAamp Viral Mini Kit » du fabricant (Qiagen, Courtaboeuf, France), l'ARN du VHC a été amplifié au niveau de la région capsidale par la technique de PCR nichée suivant le protocole décrit par (Njouom *et al.*, 2012). Les amorces HCV-CoreOS (5'-ACTGCCTGATAGGGTGCTTGCCGAG-3') et HCV-coreOAS (5'-ATGTACCCCATGAGGTCGGC-3') ont été utilisées pendant la première PCR tandis que les amorces HCV-CoreIS (5'-AGGTCTCGTAGACCGTGCATCATG-3') et HCV-CoreIAS (5'-CAYGTRAGGGTATCGATGAC-3') ont été utilisées pour la seconde PCR.

Mode opératoire

Dix microlitres (10 µL) d'ARN ont d'abord été dénaturés à 72°C pendant 10 minutes en présence de 2 µL d'amorces aléatoires (150 ng/mL) puis rétro transcrit dans 8 µL de la solution de mix de la PCR contenant: 4 µL d'eau RNase/DNase free, 1,6 µL de tampon AMV RT 5X, 0,6 µL de RNAsin et 0,8 µL de AMVRT (10UI/µL). Cinq microlitres d'ADNc ont par la suite été amplifiés dans 45 µL de mix constitué de: 35,2 µL d'eau RNase/DNase free, 5 µL de tampon 10X, 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de l'amorce HCV-coreOS (200 nM) et HCV-coreOAS 200nM, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, et 1 µL de Taq polymérase (5UI/µL). Le mélange réactionnel d'un volume de 50µL a été placé dans un thermocycleur préprogrammé à 95°C pendant 3 minutes suivi de 2 cycles de PCR à 95°C pendant 30 secondes; 60 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 1 minute) suivi immédiatement de 2 cycles avec une baisse de la température jusqu'à 51°C puis de 20 cycles à 95°C pendant 30 secondes; à 50°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 minute avec une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes. Le mélange a été chauffé à 95°C afin de dénaturer l'acide nucléique et d'exposer les séquences cibles de l'amorce puis refroidit à 60°C afin de favoriser l'hybridation spécifique de l'amorce sens et anti-sens au brin d'ADN. L'opération a été répétée à un nombre défini de cycles, chaque cycle doublant la quantité d'amplicons d'ADN. L'amplification exponentielle a lieu dans la région du génome située entre les amorces.

Dans le but d'optimiser la sensibilité et la spécificité de la réaction, une PCR nichée a été réalisée avec 2 μL des produits précédemment obtenus à l'aide des amorces HCV-coreIS et HCV-coreIAS. Brièvement, 2 μL de la solution d'amplicon ont été ajoutés à 48 μL du Mix de PCR contenant tour à tour 38,2 μL d'eau RNase/DNase free, 5 μL de tampon 10X, 5 μL de dNTPs 10 mM, 1 μL de chaque amorce, 1,5 μL de MgCl_2 50 mM, et 0,3 μL de Taq polymérase (5UI/ μL). Le mélange réactionnel d'un volume de 50 μL a été placé dans un thermocycleur en utilisant le programme de la première PCR.

Révélation des produits de PCR

Les produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur un gel d'Agarose à 1,5 % (P/V). La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose formant un réseau de pores. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migrent plus loin que les molécules de tailles supérieures. En milieu basique, les molécules d'ADN sont chargées négativement et vont migrer du pôle négatif vers le pôle positif. Les fragments d'ADN sont révélés grâce à un intercalant (Le gel green). Ce dernier émet une fluorescence lorsqu'il est excité sur un transilluminateur UV.

Séquencage des produits de PCR

Seuls les échantillons présentant une bande à la taille attendue ont été envoyés pour le séquençage. Le séquençage des produits de PCR a été effectué via la firme GENEWIZ connu avant sous le nom COGENICS basé à l'United Kingdom. Cette firme réalise le séquençage automatique à l'aide de l'équipement ABI PRISM 3140 en utilisant la méthode dite de terminaison des chaînes de Sanger grâce au kit « BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.1 » développée par APPLIED BIOSYSTEMS.

Le principe développé par Sanger repose sur la propriété de l'ADN polymérase à incorporer à la fois les nucléotides (dNTPs) et les analogues des nucléotides notamment les 2', 3'-dideoxynucleotides (ddNTPs) dans les chaînes d'ADN naissantes. Au cours de l'amplification, 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 groupement hydroxyl au côté 3'. La trousse du kit « BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.1 » utilise

quatre marqueurs fluorescents permettant de marquer les ddNTPs. Les ddNTPs fluorescents sont additionnés aléatoirement à toutes les positions de la chaîne naissante. La séparation des produits de la réaction marqués par les 4 fluorochromes est également faite par électrophorèse ou la collecte des données est faite dès l'initiation de l'électrophorèse.

Analyse phylogénétique des séquences obtenues

La phylogénie moléculaire a pour but de comprendre l'histoire évolutive d'une famille de gènes par la comparaison des séquences dérivées par des divergences successives à partir d'une séquence ancestrale commune (séquences homologues). La phylogénie a été faite en quatre étapes successives qui sont : le nettoyage *et* l'alignement des séquences. Cette étape a consisté à analyser les fichiers de type Fasta puis corriger les erreurs de lecture. Pour les produits de PCR séquencés dans les deux amorces sens et anti-sens, on a procédé à l'assemblage en « contigs » en présence des séquences dites « consensus » à l'aide du logiciel DNASTAR Lasergene SeqMan Pro (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA). Les séquences ont par la suite été vérifiées par BLAST à Pubmed pour s'assurer qu'elles sont bien celles du virus étudié en question. Après ces multiples contrôles, les séquences ont par la suite été alignées au même moment que les séquences de référence de la région amplifiée à l'aide du logiciel MEGA.6 qui utilise l'alignement multiple de Clustal W (Chenna *et al.*, 2003).

L'arbre phylogénétique a été généré en utilisant la méthode phénétique basée sur les distances génétiques dite « Neighbor-Joining method » ou la méthode du plus proche voisin. Cette méthode permet la construction des arbres sans racine à partir d'un indice d'écart et est basée sur la recherche d'une « Operational taxonomic Units » (OTU) qui minimise la longueur totale des branches à chaque étape de regroupement ou parcimonie.

Le test de contrôle de fiabilité ou « Bootstrap » a été fait afin de déterminer la robustesse des topologies des regroupements des différentes séquences. Dans cette étude, nous avons opté pour 1000 « bootstrap » ou 1000 ré-échantillonnages c'est-à-dire qu'un arbre consensus a été généré à partir de 1000 arbres. A chaque nœud de cet arbre consensus qui découle des 1000 arbres préalablement générés on note un pourcentage qui correspond à la proportion des 1000 arbres ou valeur de « bootstrap ». Cette dernière mesure la robustesse interne des différents nœuds observés et s'évalue généralement en seuil. Le seuil considéré est généralement de 70%.

Une fois l'arbre obtenu, on a mis différentes légendes explicatives et même des couleurs afin d'alléger la compréhension et l'analyse des résultats obtenus.

II.9.4 Génotypage du VHB

Les différents génotypes et sous génotypes du VHB ont été déterminés par amplification, séquençage et analyse phylogénétique de 750 nucléotides du fragment S suivant la méthode décrite par (Olinger *et al.*, 2006). Ceci n'avait été fait que pour les patients dont la charge virale hépatite virale B était détectable.

II.9.4.1 Extraction de l'ADN

L'ADN du VHB a été extrait par le kit dénommé QIAamp Viral DNA Mini Kit de (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Principe de la méthode

L'extraction et la purification de l'ADN par le kit «Qiagen» se fait à travers de petites colonnes de silice adaptées à des tubes de 1,5 à 2 ml. Les particules virales du VHB sont lysées par incubation à 56°C pendant 10 minutes, en présence de la protéinase K et d'un tampon de lyse. Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont les particules de silice d'adsorber les acides nucléiques en milieu acide *et alcoolique*. Le tampon de lyse (fourni avec le kit) a été choisi de telle sorte que les débris cellulaires, les protéines et les molécules indésirables (inhibiteurs de PCR) restent en solution alors que l'ADN se fixe sur la silice. Après centrifugation, les acides nucléiques se fixent spécifiquement sur le filtre de silice. Les substances non fixées sont éliminées et les acides nucléiques purs adsorbés sont élués par la solution tampon d'éluion.

Procédure du test

Dans des tubes Eppendorf stériles bien identifiés ont été déposés successivement 20 µL de la solution protéinase K et 200 µL de plasma. Le mélange a été homogénéisé par vortexage pendant 15 secondes. A ce mélange ont été ajouté 200 µL de la solution tampon de lyse (AL). Le mélange a de nouveau été homogénéisé puis centrifugé brièvement à 6000g pendant 30 secondes. Les tubes ont par la suite été déposés sur un incubateur réglé à 56°C pendant 10 minutes. Après incubation, 200 µl de la solution d'éthanol absolue ont été ajouté au mélange puis centrifugé brièvement à 6000g. Ce mélange a été transféré dans les colonnes

fournies par le kit puis centrifugé à 6000g pendant 1 minute afin de permettre l'adsorption des acides nucléiques sur le filtre inséré dans la colonne. Les tubes à filtre ont été déposés doucement dans les tubes collecteurs. Un volume total de 500 µL de la solution de lavage (AW1) a été pour éliminer l'excédant non fixé puis on a centrifugé pendant une minute à 6000g. Le deuxième lavage a été successivement pareillement réalisé mais avec le tampon de lavage (AW2) et une vitesse de centrifugation de 20000g. Les ADN ont été obtenus par centrifugation à 6000g des colonnes en présence du tampon d'élution.

II.9.4.2 Amplification du gène S du VHB

L'amplification du gène S du VHB a été faite par une PCR sémi-nichée en utilisant la méthode décrite par (Olinger *et al.*, 2006) à l'aide des amorces P2f (5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3') et 979 (5'-CAAAGACCCACAATTCTTTGACATACTTTCCA AT-3') utilisé au cours de la première PCR et P2f (5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3') et Mc2r (5'-GGCAATGATCCCCAACTTCCA-3') lors de la seconde PCR. Brièvement, 5 µL d'ADN ont été ajoutés à 20 µL du Mix de PCR contenant : 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de l'amorce P2f, 1 µL de l'amorce 979, 0,82 µL de MgCl₂, 2,5 µL de tampon 10X, 0,2 µL de Taq polymérase (5UI/µL) et 14,98 µL d'eau distillée stérile. Le mélange réactionnel d'un volume de 25µL a été placé dans un thermocycleur préprogrammé comme suit : 94 °C pendant 1 minute puis 40 cycles de PCR (94 °C pendant 20 secondes; 63°C pendant 20 secondes et 72°C pendant 1 minute) avec une extension finale à 72°C pendant 5 minutes. Le mélange a été chauffé (94°C) afin de dénaturer l'ADN double brin et d'exposer les séquences cibles de l'amorce. Alors que le mélange refroidit (63°C), l'amorce sens et anti-sens s'hybrident spécifiquement au brin d'ADN. L'opération a été répétée à un nombre défini de cycles, chaque cycle doublant la quantité d'amplicons d'ADN. L'amplification exponentielle a lieu dans la région du génome située entre les amorces.

Dans le but d'optimiser la sensibilité et la spécificité de la réaction, une PCR nichée a été réalisée avec 2 µL des produits précédemment obtenus à l'aide des amorces P2f et Mc2r. Brièvement, 2 µL de la solution d'amplicon ont été ajoutés à 48 µL du Mix contenant de PCR constitué tour à tour de: 38,2 µL d'eau RNase/DNase free, 5 µL de tampon 10X, 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de chaque amorce, 1,64 µL de MgCl₂ 50 mM, et 0,4 µL de Taq polymérase (5UI/µL). Le mélange réactionnel d'un volume de 50µL a été placé dans un thermocycleur programmé à 94 °C pendant 1 minute puis 30 cycles de PCR (94 °C pendant

20 secondes; 63°C pendant 20 secondes et 72°C pendant 1 minute) avec une extension finale à 72°C pendant 5 minutes.

Révélation des produits de PCR

Les produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur un gel d'Agarose à 1,5 % (P/V). La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose formant un réseau de pores. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures. En milieu basique, les molécules d'ADN sont chargées négativement et vont migrer du pôle négatif vers le pôle positif. Les fragments d'ADN sont révélés grâce au gel green un agent d'intercalation. Ce dernier émet une fluorescence lorsqu'il est excité sur un transilluminateur UV.

Seuls les échantillons présentant une bande à la taille attendue ont été envoyés pour le séquençage. Le séquençage des produits de PCR a été effectué via la firme GENEWIZ connu avant sous le nom COGENICS de l'United Kingdom. Le séquençage automatique a été effectué à l'aide de l'équipement ABI PRISM 3140 en utilisant la méthode dite de terminaison des chaînes de Sanger grâce au kit « BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.1 » développée par APPLIED BIOSYSTEMS.

Le principe développé par Sanger repose sur la propriété de l'ADN polymérase à incorporer à la fois les nucléotides (dNTPs) et les analogues des nucléotides notamment les 2', 3'-dideoxynucleotides (ddNTPs) dans les chaînes d'ADN naissantes. Au cours de l'amplification, 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 groupement hydroxyl au coté 3'. La trousse du kit « BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.1 » utilise quatre marqueurs fluorescents permettant de marquer les ddNTPs. Les ddNTPs fluorescents sont additionnés aléatoirement à toutes les positions de la chaîne naissante. La séparation des produits de la réaction marqués par les 4 fluorochromes est également faite par électrophorèse ou la collecte des données est faite dès l'initiation de l'électrophorèse.

Analyse phylogénétique des séquences obtenues

La phylogénie moléculaire a pour but de comprendre l'histoire évolutive d'une famille de gènes par la comparaison des séquences dérivées par des divergences successives à partir d'une séquence ancestrale commune (séquences homologues). La phylogénie a été faite en quatre étapes successives telles que défini plus haut (Génotypage VHB).

II.9.5 Analyse mutationnelle

L'analyse mutationnelle a été faite par amplification des fragments Pre-S (Pre-S1 and Pre-S2) et C du virus de l'hépatite B. Après extraction de l'ADN en utilisant le kit QIAamp Viral DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) suivant le protocole du fabricant. L'amplification des fragments Pre-S, Core et X a été faite suivant le protocole décrit par (Olinger *et al.*, 2006). Brièvement, les extraits d'ADN ont été amplifiés par PCR semi-nichée à l'aide des couples d'amorces répertoriés dans le **Tableau 2**.

Les amorces PreS-R et Fw2422 ont été utilisées lors de la première PCR pour le fragment preS tandis que les amorces 455 et 1800 du fragment X et fw1608 et rv2661 du fragment C. Lors de la deuxième PCR, les amorces PreS-R et fw2451, fw696 et 1800 ainsi que fw1644Xmm et rv2661 ont été utilisées respectivement pour les fragments preS, X et C.

Les deux cycles de PCR ont été faite dans 25 µL d'un mix constitué du tampon de PCR 1X, 200 Nm de dNTPs, 200 nM de chaque amorce, 1,64mM de MgCl₂, 1 U de Taq Platinum et 5 µl de la solution d'ADN. Pour le deuxième cycle de PCR, 2 µl du produit de la première PCR ont été utilisé comme solution d'ADN. Les différentes PCR ont été réalisées suivant le programme ci-après: 5 minutes de dénaturation à 95°C suivi de (40 cycles et 30 cycles de première et deuxième PCR) pendant 20 sec à 95 °C, 20 sec d'hybridation à 63°C et 90 sec d'élongation à 72 °C. Les différents produits d'amplification ont été migré par électrophorèse sur un gel d'Agarose à 1,5% puis visualisé à l'aide de la lumière ultraviolette.

Les sequence obtenues ont par la suite été corrigées à l'aide du logiciel SeqMan (DNASTAR Lasergen). Les sequences ont par la suite été alignées à l'aide du logiciel MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski et Kumar, 2013) l'analyse des mutations a été faite en ligne à l'aide du logiciel dénommé "Mutation Report Tool software" disponible dans le site internet du programme de recherche de la diversité du virus de l'hépatite B de l'Université de Witwatersrand suivant le protocole décrit par (Bell et Kramvis, 2013).

Tableau 2: Caractéristiques des amorces utilisées lors de l'analyse mutationnelle VHB

| Nom | Séquence 5'-3' | Gène | Position (pb) | Tm (°C) |
|---------|--------------------------------|-------|---------------|---------|
| Fw 2422 | AGAACTCCCTGCCTCGCAGAC | Pré S | 2375-2396 | 67 |
| PreS-R | ACAGGCGGKGTTCCTTGTTGA | Pré S | 199-222 | 65 |
| Fw 2451 | TCAATCGCCGCGTCGCAGAA | Pré S | 2404-2423 | 63 |
| Fw 1608 | GCATGGAGACCACCGTGAACG | C | 1606-1626 | 65 |
| Rv 2661 | CAATTTGTAGGTCCTCTAACAGTAAATGAA | C | 2586-2615 | 60 |
| Fw 1644 | TGCCCAAGGTCTTACATAATAGGACTCTTG | C | 1639-1668 | 64 |
| Fw 455 | CAAGGTATGTTGCCCGTTT | X | 455-473 | 58 |
| Rv 1800 | TAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT | X | 1771-1800 | 64 |
| Fw 696 | CAGTGGTTCGTTAGGGCTTCC | X | 694-715 | 63 |

Pour ce qui est de l'analyse des mutations au niveau des gènes core et NS5B du VHC les séquences obtenues lors du génotypage ont de nouveau été utilisées pour l'analyse mutationnelle à l'aide du logiciel MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Brièvement, les séquences de chaque gène ont d'abord été alignées en présence des séquences de références des régions spécifiques puis traduites en acides aminés.

II.9.6 Identification des altérations génétiques circulant associées au développement du CHC

Bien que l'infection par le VHB, VHC et la consommation excessive d'alcool soient les principaux facteurs associés au développement du carcinome hépatocellulaire, une minorité des patients diagnostiqués d'un CHC peut également présenter des sérologies hépatites B et C négatives et ne pas consommer d'alcool. Cela suggère donc l'implication d'autres facteurs de risque dans le développement du carcinome hépatocellulaire.

De nombreux travaux ont montré que diverses mutations du gène suppresseur de tumeur p53 (*TP53*) ainsi que certaines anomalies chromosomiques ou de l'ADN mitochondrial sont hautement prévalentes au cours du développement du CHC (Pineau *et al.*, 2008). Ces altérations pourraient donc constituer un gisement de nouveaux biomarqueurs permettant le dépistage précoce ou le suivi thérapeutique des patients atteints de CHC.

II.9.6.1 Extraction de l'ADN

L'ADN contenu dans nos échantillons de plasma et la phase leuco-plaquettaire (buffy coat) a été extrait par la méthode au phénol-chloroforme. Cette méthode permet de séparer les constituants d'un mélange par solubilisation différentielle des molécules entre deux phases non miscibles.

Comme toute méthode d'extraction, la méthode d'extraction au phénol chloroforme passe également par les étapes suivantes: la lyse cellulaire, l'élimination des protéines et lipides, la précipitation puis concentration de l'ADN. Brièvement, dans des tubes ont été ajouté tour à tour la protéinase K (diluée au 200^e), l'échantillon contenant l'ADN à extraire (plasma ou buffy coat) et une solution tampon constituée de (Tris-HCl Ph 8 à 10mM ; NaCl 10 mM ; EDTA 10 Mm et SDS 2%) le mélange a été délicatement homogénéisé puis incubé dans une chambre chaude toute une nuit (14,0°C over night). Après incubation, les protéines et les lipides contenus dans le lysat ont été éliminés par ajout de biophénol (pH 8) et le chloroforme isoamyl-alcool (0,5 v/v chacun) dans le lysat. Ce mélange a ensuite été homogénéisé par agitation tridimensionnelle puis centrifugé à 2000 tours pendant 15 minutes jusqu'à obtention de deux phases distinctes. La phase aqueuse contenant notre acide nucléique a été récupérée puis additionnée à un agent facilitant l'agrégation des molécules d'ADN comme l'acétate de sodium (fd=10) ainsi qu'un véhicule inerte tel que le glycogène ou le dextran (fd=1000). L'ADN a été précipité sous forme de pelote par ajout de 2,5 fois un volume d'éthanol absolu (100%). Après incubation à froid (-80°C), les tubes ont été centrifugés à 4000trs/minute pendant une 1h puis lavés à l'aide d'une solution d'éthanol à 70%. Après séchage, l'ADN contenu dans les tubes a été suspendu dans un tampon TE. La qualité et la pureté de nos extraits a été évaluée et seule les extraits de bonne qualité ont été conservé à -80°C pour les analyses ultérieures.

II.9.6.2 Quantification des acides nucléiques

Le taux d'ADN contenu dans nos extraits a été évalué par le test fluorométrique en utilisant les kits Qubit^R HS DNA Assay pour les extraits plasmatiques possédant de faibles

quantités d'ADN et Qubit^R BR DNA Assay pour les extraits lymphocytaires renfermant les grandes quantités d'ADN. Cette méthode tout comme la méthode spectrophotométrique permet d'évaluer à la fois la pureté et la quantité d'ADN contenu dans les extraits. Elle est basée sur l'évaluation de la fluorescence émise par le fluorophore fixé sur la molécule d'ADN double brin. L'intensité de la fluorescence émise au cours de la réaction est directement liée au taux d'ADN double brin contenue dans notre extrait. Les quantités d'ADN trouvées ont été renseignées dans l'étiquette de chaque extrait car, pour les analyses, de nombreuses dilutions ont été faites de manière à ramener tous les extraits à la même concentration et les tester toutes dans les mêmes conditions. On a procédé à l'évaluation de l'intégrité des ADN contenu dans nos échantillons.

II.9.6.3 Evaluation de l'intégrité de l'ADN et du rendement d'extraction

L'intégrité de l'ADN lymphocytaire extrait à partir des buffy coat a été évaluée par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) classique en utilisant les amorces capables de cibler le gène de la Bêta-globine. L'amplification du gène de la bêta-globine a été faite par une PCR classique en utilisant les amorces BGlobs (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' Tm 63,1°C) et BGlobr (5'-GAAGGAGCCAAGGACAGGTAC-3' Tm 60,3°C). Brièvement, 1 µL d'ADN a été ajouté à 24 µL d'un Mix contenant : 0,4 µL de dNTPs (12,5 mM), 0,1 µL de l'amorce BGlobs, 0,1 µL de l'amorce BGlobr, 15,6 µL de tampon PM, 0,2 µL de Taq polymérase (5UI/µL) et 7,6 µL d'eau distillée stérile. Le mélange réactionnel d'un volume de 25µL est placé dans un thermocycleur préprogrammé à 95 °C pendant 1 minute puis 35 cycles de PCR (95 °C pendant 15 secondes; 55°C pendant 15 secondes et 72°C pendant 15 secondes) avec une extension finale à 72°C pendant 1 minute. Le mélange a été chauffé (95°C) afin de dénaturer l'ADN double brin et d'exposer les séquences cibles de l'amorce. Alors que le mélange refroidit (55°C), l'amorce sens et anti-sens s'hybrident spécifiquement au brin d'ADN. L'opération a été répétée à un nombre défini de cycles, chaque cycle doublant la quantité d'amplicons d'ADN. L'amplification exponentielle a lieu dans la région du génome située entre les amorces. Les produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur un gel d'Agarose à 1,5 % (P/V).

La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose formant un réseau de pores. Les molécules de petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de

tailles supérieures. En milieu basique, les molécules d'ADN sont chargées négativement et vont migrer du pôle négatif vers le pôle positif. Les fragments d'ADN sont révélés grâce au gel green un agent d'intercalation. Ce dernier émet une fluorescence lorsqu'il est excité sur un transilluminateur UV. Après migration sur un gel d'Agarose à 1,5%, seuls les échantillons positifs c'est-à-dire présentant une bande unique et nette à 250 paires de bases ont été retenus et rangé à la chambre froide (-20°C) pour les utilisations ultérieures.

L'intégrité de l'ADN plasmatique a été vérifiée par PCR temps réel quantitative (qPCR). Le principe est basé sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction. L'amplification du gène SPEF2 a été faite par une PCR en temps réel quantitative en utilisant les amorces SPEF2 ex10s (5'-GTGCACTTCATGTTGGATG-3' Tm 66,3°C) et SPEF2 ex10r (5'-GGATGGGGAGAGTAGGATGG-3' Tm 64,5°C). Brièvement, 2 µL d'ADN ont été ajoutés à 8 µL de PCR Mix contenant : 5 µL d'iTaqSYBR Bio-Rad 2x, 0,05 µL de chaque amorce et 2,9 µL d'eau RNase/DNase free. La plaque BIO-RAD Hard Shell^R a été scellée par un film spécifique appelé Roller for Microseal Film et le mélange réactionnel d'un volume de 10 µL a été inséré dans un thermocycleur BIO-RAD CFX 96TM Real-Time System préprogrammé à 95 °C pendant 3 minute puis 40 cycles de PCR (95 °C pendant 5 secondes et 60°C pendant 15 secondes) avec une étape de dissociation programmée de 60°C à 95 °C par palier de 0,5°C. La détection a été faite par collection des données à chaque cycle d'amplification à l'aide du SYBR Green un agent qui se lie aux doubles brins de l'ADN. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles, moins il faudra de cycles pour atteindre le point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond connu sous l'appellation de « threshold cycle » (Ct). Seuls les échantillons positifs c'est-à-dire présentant une valeur de Ct détectable ont été retenus et rangé à -20°C pour les utilisations ultérieures.

Afin d'avoir une idée sur le rendement d'extraction, le volume d'extrait a été déterminé et le rapport entre le volume d'extrait obtenu et le volume de la matrice initiale utilisée calculé. La détermination du volume d'extrait d'ADN a permis d'estimer le nombre de réaction que l'on peut réaliser avec chaque extrait.

II.9.6.4 Evaluation de quelques altérations génétiques somatiques

Le cancer primitif du foie est un processus multi-factoriel pouvant provenir des altérations diverses.

II.9.6.4.1 Quantification du taux d'ADN mitochondrial

La quantification relative de l'ADN mitochondrial a été réalisée en utilisant la technique de qPCR en temps réel dans les lymphocytes normalisés par rapport à la quantité d'ADN nucléaire. Cela a été faite par une qPCR sur le gène de la bêta-actine à l'aide des amorces mt15264s (5'-CCACCCTCACACACGATTCTTT3' Tm 66,9°C) et mt15363r (5'-GGTGATTCTAGGGGGTTGT-3' Tm 63,8°C) pour la mitochondrie et ACTBs (5'-ACCCACACTGTGCCCATCTAC Tm 66,1°C) et ACTBr (5'-TCGGTGAGCATCTTCATGAGGTA Tm 66, 8. Brièvement, 2 µL d'ADN ont été ajoutés à 8 µL de PCR Mix contenant : 5 µL d'iTaqSYBR Bio-Rad 2x, 0,05 µL de chaque amorce et 2,9 µL d'eau RNase/DNase free.

La plaque BIO-RAD Hard Shell^R a été scellée par un film spécifique appelé Roller for Microseal Film et le mélange réactionnel d'un volume de 10 µL a été placé dans un thermocycleur BIO-RAD CFX 96TM Real-Time System préprogrammé à 95 °C pendant 3 minute puis 40 cycles de PCR (95 °C pendant 5 secondes et 60°C pendant 15 secondes) avec une étape de dissociation programmée de 60°C à 95 °C par palier de 0,5°C. La détection a été faite par collection des données à chaque cycle d'amplification à l'aide du SYBR Green un agent qui se lie aux doubles brins de l'ADN. Le taux d'ADNmt de chaque patient a été déterminé en faisant la différence entre le taux trouvé en qPCR en mitochondrie et celui trouvé avec de la beta-actine pour avoir la quantité en ADNmt réelle suivant la formule suivante $Rc=2^{DCT}$ avec DCT= CtBéta-actin-CtMitochondrie.

II.9.6.4.2 Détermination des différents haplogroupes mitochondriaux

Les différent haplogroupes mitochondriaux ont été déterminés par amplification et séquençage de 546 pb des régions hypervariables (HVR1 et HVR2) du gène DLOOP du génome mitochondrial suivant le protocole décrit par (Kawabe *et al.*, 2014). Brièvement, 1 µL d'ADN a été ajouté à 24 µL de PCR Mix contenant : 0,2 µL de dNTPs (10 mM), 0,2 µL de l'amorce DLOOP-Sens (5'-AGGACTACGGCTTGAAAAGC-3'), 0,2 µL de l'amorce DLOOP-anti sens (5'-ATGTGCCTGACCGAGGAACCAG-3'), 15,6 µL de tampon maison PM, 0,3 µL de Taq polymérase (5UI/µL) et 7,3 µL d'eau distillée stérile. Le mélange réactionnel d'un volume de 25µL a été placé dans un thermocycleur préprogrammé à 94 °C pendant 1 minute puis 35 cycles de PCR 94°C pendant 2 minutes, (94 °C pendant 30

secondes; 55°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 minute et 20 secondes) avec une extension finale à 72°C pendant 5 minutes.

Les patients positifs en PCR après révélation sur lumière ultra-violette ont par la suite été traité avec l'Exonucléase I et de Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP) pour éliminer les dNTPs et les amorces sens et anti sens contenus dans nos amplicons suivant le mix constitué tour à tour de 1µl d'amplicon, 4,9µl d'eau distillée stérile, 15,6 µl d'EXO I, 0,4µL de SAP, 7,3 µl de PM et 0,1µl de chaque amorce sens et anti sens à ajouter dans mix différents. La plaque constituée des mix des deux amorces a par la suite été déposé dans le thermocycleur programmé à 37°C pendant 15 min et 85°C pendant 15 min. Après cette étape, 10 µl du milieu réactionnel constitué de chaque amorce ont été envoyé pour séquençage. Le séquençage a été fait à l'aide de la firme commerciale Eurofins Scientific (Nantes) qui utilise la méthode de Sanger. Les séquences obtenues en fichier « Fasta » ont par la suite été analysées en présence des séquences de référence de la région amplifiée en se servant du lien Mitomap suivant (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>) pour la détermination des différents haplogroupes.

II.9.6.4.3 Identification de la mutation R249S du gène p53

L'identification de la mutation R249S a été réalisée par le kit QX200 droplet digital PCR (ddPCR) system de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, USA) suivant les recommandations du fabricant tel que décrit par (Castellanos-Rizaldos *et al.*, 2015). Cette technique est très sensible et capable de détecter les événements rares. La ddPCR consiste dans un premier temps à générer plusieurs gouttelettes (droplets) plusieurs milliers, ensuite réaliser une PCR dans chacune des gouttelettes produite et de procéder à l'analyse individuelle des droplets de chaque échantillon.

Génération des gouttelettes:

Brièvement, 20µl de mix constitué de 2µl d'ADN, 7,2 µl d'eau stérile, 0,8µl du réactif 40x SNP R249S Life et 10µl du réactif ddPCR Superm 2x (Souche muté et sauvage) ont été vigoureusement déposé de façon à ne pas produire les bulles dans les puits échantillons de la barrette constituée de trois types de puits disposés parallèlement trois à trois. Dans cette même barrette (puits du bas) ont été déposé 70µL d'huile d'émulsion (Droplet generation oil for probe). Avant d'insérer la barrette constituée d'un puits avec le mix, un puits avec l'huile d'émulsion et l'autre prêt à recevoir les gouttelettes dans le générateur, la barrette a été

bouchée à l'aide d'un caoutchouc appelé « Droplet Generator DG8 Gasket ». La barrette a par la suite été déposée dans le générateur de gouttelettes ou « Qx200 Generator Droplet ». La fin de la production des gouttelettes était caractérisée par un signal sonore.

Amplification par PCR thermique:

Un total de 40 μ L (plusieurs gouttelettes) a été vigoureusement aspiré par échantillon puis déposé dans la plaque de PCR contenu dans le kit. La plaque a par la suite été bien scellée à l'aide d'un « Perceable Foil Heat Seal ». Après l'étape du scellage, on l'a amplifié à l'aide du programme suivant: 94°C pendant 10 min (94°C pendant 30 minutes, 59°C pendant 1 min et 72°C pendant 10 min) pendant 40 cycles et 98°C pendant 10 min. Cette étape a consisté à effectuer une qPCR TaqMan en présence des sondes FAM spécifique de l'allèle muté et la sonde VIC spécifique de l'allèle sauvage sur chaque gouttelette généré.

Analyse des résultats:

Après amplification, la plaque a été insérée dans le lecteur Quantalife Qx100 droplet reader puis à l'aide du logiciel Quantas off 1.7 on a par la suite procédé au comptage des gouttelettes individuel puit par puit ainsi qu'à leur quantification. Au cours de la lecture, l'appareil a quantifié pour chaque gouttelette individuellement les niveaux de fluorescence en FAM et VIC.

II.9.6.4.4 Identification du polymorphisme du codon 72 du gène p53 (SNP R72P)

Le polymorphisme R72P du gène p53 a été étudié par PCR quantitative en temps réelle suivant le protocole et les recommandations du fabricant du kit Platinum qPCR Supermix for SNP Genotyping (ThermoFisher Scientific, USA). Brièvement, un volume de 2 μ L d'ADN a été ajouté à 8 μ L de PCR Mix contenant : 0,25 μ L de la solution d'amorces 40x Primer life, 5 μ L du master mix de génotypage et 2,75 μ L d'eau distillée stérile. Le mélange réactionnel d'un volume de 10 μ L a été placé dans un thermocycleur préprogrammé à 95 °C pendant 10 minutes puis, 40 cycles de (95 °C pendant 15 minutes et 60°C pendant 1 minute. La détection a été faite par collection des données à chaque cycle d'amplification à l'aide de la sonde de TaqMan qui est une sonde bi-marqué et dont l'augmentation de la fluorescence est proportionnelle au produit de PCR. Le principe de la sonde Taqman repose sur la fonction 5' vers 3' exonucléasique de la Taq polymérase. La sonde Taq Man est marquée en 5' par un fluorophore appelé « Reporter » et en 3' par le reporter appelée « Quencher ».

II.9.6.5 Analyses statistiques

Les variables quantitatives ont été présentées en moyennes et écarts types puis comparées à l'aide des tests de Mann-Whitney U et le T test. Les variables catégorielles ont été exprimées en effectifs et proportions. L'analyse a évalué les facteurs tels que le sexe et l'âge sur le développement des cancers primitifs du foie en utilisant le test de l'indépendance de khi-carré. Les rapports de côte encore appelés « Odd ratio » qui permettent d'identifier le risque associé à l'infection par les virus des hépatites B, C, D et E ont été déterminés à l'aide du le modèle de régression logistique conditionnel. Seules les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées significatives. Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées à l'aide des logiciels SPSS 16.0 et Prism 6.0 (GraphPad Inc, La Jolla, CA, USA).

III.1. RESULTATS

III.1.1. Partie rétrospective

La partie rétrospective de ce travail a été réalisée dans le but d'identifier les différents types et sous types de cancers primitifs du foie diagnostiqués chez les patients Camerounais. L'identification de ces sous types permet de prédire le pronostic du patient.

III.1.1.1. Caractéristiques des patients inclus

Au total 2068 biopsies ont été repertoriées et parmi ces biopsies, 360 étaient de type hépatique et ont été retenues pour la présente étude. Le Tableau 3 ci-dessous présente les caractéristiques démographiques des patients inclus.

De Janvier 2004 à Janvier 2013, un total de 360 patients a été enregistré pour une demande de biopsie hépatique. Parmi ces patients, 228 (63.3%) étaient de sexe masculin tandis que 132 (36.7%) étaient de sexe féminin.

Les différents patients recensés dans cette partie ont par la suite été répartis en diverses tranches d'âges (Tableau 3). Nos résultats montrent que la tranche d'âge comprise entre 20 à 30 ans était la plus représentative et suggèrent une forte prévalence des problèmes hépatiques chez les jeunes adultes Camerounais.

III.1.1.2. Différents types de cancers du foie

Parmi les 360 biopsies hépatiques enregistrées, seules 93 (25,8%) présentaient des lésions cancéreuses de types primitives et secondaires. Les cancers primitifs ont été repertoriés chez 81 (87,09%) patients tandis que les cancers secondaires ont été repertoriés chez 12 (12,90%) patients (Tableau 3).

Sur les 81 patients diagnostiqués avec les cancers primitifs du foie, 98.8% (80/81) présentaient un carcinome hépatocellulaire (CHC) et un seul patient âgé de deux ans (1.2%) a été diagnostiqué par un hépatoblastome (Tableau 3).

III.1.1.3. Etiologie des différents types de cancers primitifs répertoriés.

L'analyse des facteurs pouvant être à l'origine de la survenue des cancers primitifs est présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3: Les caractéristiques socio-démographiques des patients.

| <i>Paramètres</i> | CHC n=80 | Hépatite n=247 | Seuil de significativité | |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|---|----------|
| <i>Age (moyenne±SD)</i> | 38,1 ± 15,2 | 35,6 ± 12,5 | 0.21 (ns) | |
| <i>Ratio Male:Femele</i> | 1,9 (52/28) | 2,04 (166/81) | ns | |
| <i>Facteurs de risque (%)</i> | | | | |
| | <i>VHB</i> | 52,5% | 5,8% | 0,008 |
| | <i>VHC</i> | 36,5% | 38,0% | ns |
| | <i>Indéterminé</i> | 11,2% | 56,2% | 3,07 E-5 |
| <i>Steatose(%)</i> | | | | |
| | <i>Total</i> | 60,0 | 5,9 | |
| | <i>VHB</i> | 23,5 | 1,2 | |
| | <i>VHC</i> | 75,5 | 4,7 | |
| | <i>Unknown risk</i> | 1,01 | 00 | na |
| <i>Morphologies</i> | | | | |
| | <i>Microtrabéculaire</i> | 42,6 | -- | |
| | <i>Macrotrabéculaire</i> | 13,7 | -- | na |
| | <i>Acinairer-Pseudoglandulaire</i> | 32,5 | -- | |
| | <i>Fibreux</i> | 11,2 | -- | |
| <i>Fibrose</i> | | | | |
| | | n=73 | n=210 | |
| | <i>F0</i> | 5,4 | 9,5 | |
| | <i>F1</i> | 9,5 | 52,8 | |
| | <i>F2</i> | 38,3 | 28,5 | 0,0321 |
| | <i>F3</i> | 24,6 | 5,7 | 8,8 E-14 |
| | <i>F4</i> | 20,5 | 33 | 3,9 E-6 |
| <i>Necro-inflammation</i> | | | | |
| | | n=74 | n=237 | |
| | <i>A0</i> | 2,7 | 3,3 | |
| | <i>A1</i> | 33,8 | 37,1 | ns |
| | <i>A2</i> | 41,9 | 45,9 | ns |
| | <i>A3</i> | 20,2 | 13,5 | 0,0334 |
| <i>Variants Cellulaire</i> | | | | |
| | <i>Cellules claires</i> | 12,5 | 24,9 | 0,0279 |
| | <i>Cellules déformées</i> | 3,7 | 25,9 | 4,3 E-6 |

CHC: Carcinome hépatocellulaire; **VHB:** Virus de hépatite B, **VHC:** Virus de l'hépatite C; **F0** = Pas de fibrose; **F1** = Fibroses portale sans septa; **F2**= Fibrose portale avec quelques Septa; **F3** = Plusieurs septa sans cirrhose; **F4** = Cirrhose; **A0** = Absant; **A1** = Faible; **A2**= Modéré; et **A3** = Sévère; **M:** male; **F:** femele; **ns:** non significatif, **na:** non applicable.

Nos résultats montrent que le CHC est le seul type de cancer primitif (CPF) diagnostiqué chez l'adulte Camerounais et confirment une fois de plus que le CHC est le type de CPF le plus fréquemment diagnostiqué au monde. L'analyse des facteurs de risque

associés à chaque CPF identifié dans la présente étude a ensuite été réalisée et montre une très forte prévalence du virus de l'hépatite B chez les patients avec des lésions cancéreuses, comparé aux patients sans lésions ($P=0,008$). Nos résultats montrent également une répartition de l'infection par le virus de l'hépatite C non significative dans les deux groupes de patients.

Ces résultats suspectent une forte implication du VHB dans le développement du CHC au Cameroun. Comme Remarque, certains patients diagnostiqués avec des lésions cancéreuses ne renfermaient pas d'étiologie clairement définie (11, 2%) dans la base des données analysées. Ceci suggère l'implication des facteurs non viraux dans le développement des cancers primitifs du foie au Cameroun.

Les différents types morphologiques de CHC sont présentés dans le Tableau 3. Il ressort que le type trabéculaire (micro et macrotrabéculaire) est le plus fréquent avec plus de 50% de cas. Notre résultat sur la prédominance du type trabéculaire suggère un pronostic très sombre caractéristique d'une survie comprise entre 5 et 8 mois. Autre Remarque importante, les patients CHC infectés par le virus de l'hépatite C présentaient une stéatose élevée comparé à ceux non infectés par l'hépatite C.

III.1.2. Partie prospective

La partie prospective de cette étude était de type cas-témoins et avait pour but d'identifier l'étiologie virale et les altérations génétiques associées au développement des cancers primitifs du foie chez les patients Camerounais.

De Février 2013 à Janvier 2014, un total de 88 patients diagnostiqués d'un carcinome hépatocellulaire a été inclus dans la présente étude. Parmi ces patients, 51,1% étaient de la région du centre; 31,8% étaient de l'Ouest; 4,5% étaient de l'Est; 5,7% étaient du littoral et 3,4% étaient du Nord. Les différentes régions et Ethnies des patients inclus sont résumées dans le tableau 4.

Sur les 88 cas inclus dans la présente étude, seuls 85 avaient été appariés en sexe et en âge (± 5 ans) à des patients sans aucun signe d'affection hépatique et sans carcinome hépatocellulaire qualifiés de témoins du groupe 1 (Tableau 4). Parmi ces témoins 1, un total de 21 patients provenait du Service de cardiologie, 30 du Service d'infectiologie, 12 provenaient du Service des Urgences chirurgicales et 20 étaient des gardes-malades.

Tableau 4: Régions et ethnies des patients cancers inclus

| Région d'origine | Ethnies | Pourcentages |
|------------------|---------------|---------------|
| Centre | Béti | 73,3% (33/45) |
| | Bassa'a | 20% (9/45) |
| | Bafia | 6,7% (3/45) |
| | Nanga | 2,2% (1/45) |
| Ouest | Dschang | 17,9% (5/28) |
| | Bamoun | 14,3% (4/28) |
| | Bangaté | 14,3% (4/28) |
| | Bafan | 10,7% (3/28) |
| | Baham | 10,7% (3/28) |
| | Mbouda | 10,7% (3/28) |
| | Bansoua | 7,14% (2/28) |
| | Bangou | 7,14% (2/28) |
| | Bamenda | 7,14% (2/28) |
| Nord | Foulbé | 7,14% (2/28) |
| Sud | Béti (Boulou) | 3,5% (3/88) |
| Est | Bobilis | 4,5% (4/88) |
| Littoral | Douala | 3,5% (3/88) |

On note une diversité d'ethnies dans les régions du Centre et de l'Ouest. L'étude s'étant déroulée dans la région du Centre on note une très forte prédominance des patients originaires de cette région.

Les moyennes d'âges entre les cas et les témoins ne présentaient aucune différence statistiquement significative dans les deux groupes. L'âge moyen des cas était de 46,0±18,8 ans (Tranche d'âge allant de 8-93 ans) tandis que l'âge moyen des témoins était de 42,1±16,4 ans (Tranche: 11-82 ans). Les patients de sexe masculin sont prévalamment infecté par le carcinome hépatocellulaire avec un *sex ratio* (Mâle/female) de 2, 3 (Tableau 5).

III.1.2.2. Séroprévalences des hépatites B, C et Delta chez les Cas et les témoins

Différents marqueurs sérologiques de l'infection par le virus de l'hépatite B ont été analysés dans la présente étude (Tableau 6). L'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg) a été significativement détecté chez 65,9% (58/88) cas et 10,6% (9/85) témoins ($p < 0,0001$). Pour ce qui est de la détection des anticorps dirigés contre l'antigène core du

VHB (anti-HBc), ils ont été trouvés positifs chez 82,9% (73/88) des cas et 78,8% (67/85) des témoins (NS). Les anticorps dirigés contre l'antigène de surface du VHB (anti-HBs) ont par contre été trouvés positifs chez 26,1% (23/88) cas et 69,4 (59/88) témoins respectivement.

La résolution de l'infection définit par la présence à la fois chez le même patient des anti-HBc et des anti-HBs a été décelée chez 12,5% des cas et 45,1% des témoins ($p < 0,05$).

En ce qui concerne la séroprévalence de l'hépatite Delta, elle n'a été recherchée que chez les patients qui présentaient un résultat positif en hépatite B, c'est-à-dire présence de l'antigène S du virus (HBsAg). Sur les 58 patients cancéreux (cas) et 9 témoins positifs pour l'AgHBs, la coinfection Delta identifiée par la détection des anticorps (anti-VHD) a été répertoriée chez 41,4% (24/58) cas et 11,1% (1/9) témoins 1 respectivement ($p < 0,05$) (Tableau 6).

Tableau 5: Les caractéristiques démographiques des cas et des témoins inclus.

| Caractéristiques | Cas de CHC (N=88) | Témoins (N=85) |
|---------------------------|-------------------|----------------|
| Sexe | | |
| Masculin | 61 (69.32%) | 59 (69.4%) |
| Féminin | 27 (30.68%) | 26 (30.6%) |
| Age (Années) | | |
| Moyenne d' âge | 46.01±18.81 | 42.11±16.40 |
| Tranches d' âge | 8-93 | 11-82 |
| Intervalles d' âge | | |
| <20 | 5 | 5 |
| 20-39 | 36 | 36 |
| 40-59 | 22 | 22 |
| ≥60 | 25 | 22 |

Nos résultats confirment l'hyper endémicité du virus de l'hépatite B au Cameroun avec une forte prévalence des marqueurs de contact (anti-HBc) à la fois chez les cas et les témoins.

Pour ce qui est de la séroprévalence de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC), les anticorps dirigés contre l'infection par le VHC (Anti-VHC) ont été significativement

détectés chez les cas, comparé aux témoins 1 sans cancer avec les prévalences respectives de 26,3% (23/88) et 3,5% (3/85) ($p < 0,0001$). De façon globale, nos résultats montrent une très forte prévalence des marqueurs sérologiques de l'infection par les virus des hépatites B, C et D chez les patients diagnostiqués d'un carcinome hépatocellulaire, comparés aux témoins 1 sans cancers. On a par la suite investigué la coinfection hépatite B et C puis la triple infection hépatite B, C et D. Comme résultats, la coinfection a été observée chez 5,7% (5/88) cas et 1,2% (1/85) témoins tandis que la triple infection n'a été décelée que chez un seul cas. Cependant, sur les 88 cas inclus dans la présente étude, 16% (14) ne présentaient aucun marqueur sérologique d'infection par les hépatites virales B, C et D; ce qui montre une fois de plus l'implication d'autres facteurs de risque sur le développement des cancers primitifs du foie au Cameroun.

III.1.2.3. Evaluation du risque associé à l'infection par les hépatites B, C, D et le CHC

L'identification du risque associé à la présence des marqueurs sérologiques d'infection par les trois virus a été évaluée par le calcul des Odds ratio (OR). Dans la présente étude, seuls les odds ratio supérieurs à 1 et significatifs ($p < 0,05$) ont été considérés comme facteurs de risque. Nos résultats montrent une très forte implication des trois virus dans le développement du carcinome hépatocellulaire. Le risque associé à l'infection par les hépatites B, C et Delta est de: 16,3 (7,2-37,1); 9,6 (2,8-33,6) et 29,3 (4,1-123,1) respectivement (Tableau 6). Les valeurs entre parenthèses représentent les intervalles de confiance à 95%.

Dans le but d'évaluer la répartition de chaque facteur de risque au sein de notre population d'étude, nos patients ont été répartis en quatre intervalles d'âge (Tableau 6). Comme résultats, les patients cancers présentant des sérologies hépatite B positives avaient une moyenne d'âge significativement faible ($39,04 \pm 14,7$ ans), comparé aux patients cancers de sérologie hépatite C positive ($64,6 \pm 15,5$ ans). Nos résultats montrent donc que l'infection par le virus de l'hépatite B touche plus les jeunes adultes au Cameroun comparé aux personnes âgés.

Tableau 6: Prévalence de l'hépatite B, C, D et risque associé au carcinome hépatocellulaire chez les cas et les témoins.

| Marqueurs hépatiques | Témoins | | Cas de CHC | | Risque de CHC non ajusté | | Risque de CHC ajusté | |
|----------------------|---------|------|------------|-------|--------------------------|-----------|----------------------|-------------|
| | No | % | No | % | OR | (95% IC) | OR | (95% IC) |
| Sérologie VHB | | | | | | | | |
| HBsAg positif | 9 | 10,6 | 58 | 65,9 | 16,3 | 7,2-37,1 | 141,7 | 11,5-1747,6 |
| HBeAg positif | 1 | 11,1 | 5 | 8,6 | 11,2 | 0,6-207,3 | 38,79 | 4,04-305,2 |
| Anti-HBc positif | 67 | 78,8 | 73 | 82,9 | 1,31 | 0,6-28 | 0,68 | 0,03-16,7 |
| Anti-HBs positif | 59 | 69,4 | 23 | 26,1 | 0,16 | 0,8-3,2 | 0,56 | 0,018-15,1 |
| Sérologie VHC | | | | | | | | |
| Anti-VHC positif | 3 | 3,5 | 23 | 26,1 | 9,7 | 2,7-33,6 | 51,9 | 3,8-711,03 |
| Sérologie VHD | | | | | | | | |
| Anti-VHD positif | 1 | 1,17 | 24 | 27,27 | 29,3 | 4,1-1231 | 35,65 | 3,66-682,16 |

NOTE : Analyses ajustées représentent le model multivariable incluant l'âge et le sexe des patients.. Abbreviations : CHC, Carcinome hépatocellulaire; VHB, virus de l'hépatite B; VHC, virus de l'hépatite C; HBsAg, Antigène de surface du VHB; Anti-HBc, Anticorps dirigé contre l'antigène core du VHB; Anti-HBs, anticorps dirigé contre l'antigène de surface du VHB; Anti-HCV, anticorps dirigé contre le VHC; Anti-VHD, anticorps dirigé contre le VHD ; IC, Intervalles de confiance; OR, Odds Ratio.

Nos résultats suggèrent une très forte implication des virus de l'hépatite B et C sur le développement du CHC chez les patients Camerounais. Cependant, il est nécessaire de noter que la coïnfection par l'hépatite Delta est un facteur aggravant car nos résultats montrent une duplication du risque qui passe de 16 à presque 30. Ce qui suggère que la coïnfection hépatite B/hépatite Delta pourrait être le principal facteur associé au développement du CHC chez les patients Camerounais.

III.1.2.4. Evaluation du risque additif associé à l'infection par le virus de l'hépatite E.

Depuis quelques années, les études ont démontré le passage de l'hépatite E en phase chronique chez les patients immunodéprimés (VIH positifs), les transplantés, les patients cancéreux subissant la chimiothérapie et les patients présentant une première hépatite B ou C positive. Il faut rappeler que sur plusieurs millions de personnes qui sont au contact d'une hépatite virale B ou C, seule une minorité progresse vers le carcinome hépatocellulaire. Ce

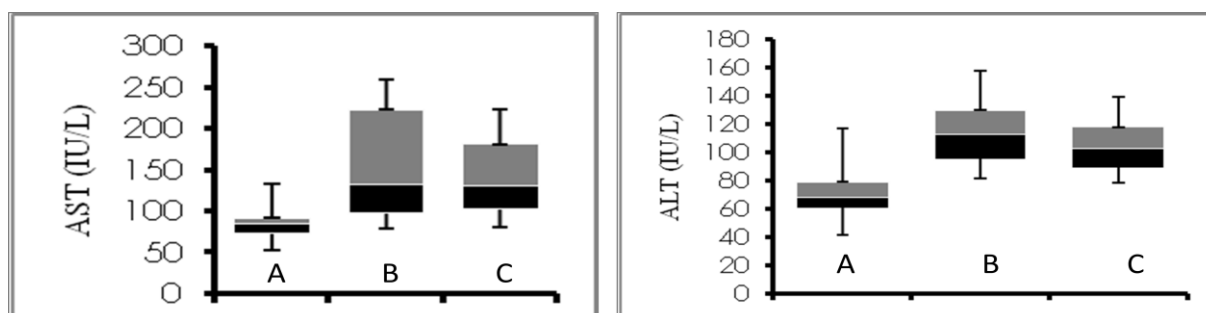
qui laisse croire qu'en plus de l'infection par le VHB et VHC, il existerait peut-être des facteurs additifs qui font passer certains patients au stade chronique.

Pour vérifier cette hypothèse, on a réparti nos patients en 3 groupes : le groupe 1 constitué des patients sans aucun signe d'affection hépatique et sans hépatite B ou C que l'on a apparié aux patients du groupe 2 sans cancer primitif du foie mais de sérologie hépatite B ou C positive et un groupe 3 constitué de patients avec un cancer primitif du foie associé à une hépatite virale B ou C.

Les immunoglobulines G et M, signes d'une infection ancienne ou récente respectivement par le virus de l'hépatite E ont été évaluées dans les 3 groupes de patients (Tableau 8). Les résultats montrent une très forte prévalence des marqueurs d'infections par l'hépatite E (IgG et/ou IgM) chez les patients présentant des sérologies hépatite B et C positives avec ou sans cancer, avec des prévalences en IgG significativement ($p=0,0009$) plus élevées chez les cas, comparé aux deux groupes de témoins (Tableau 7). Ceci justifie clairement la vulnérabilité à d'autres infections tel que l'hépatite E chez les patients présentant déjà une première hépatite B ou C. Cependant, le marqueur de l'infection récente IgM a été significativement détecté chez les patients de sérologies hépatite B ou C positives comparé aux patients cancers et aux témoins sans hépatite B et C (Tableau 7).

On a par la suite évalué le risque associé à la présence de l'hépatite E chez les cas et les témoins (Tableau 7). Nos résultats montrent une multiplication du risque de progression vers le CHC en cas d'une seconde infection par le virus de l'hépatite E, avec une valeur de Odd ration et l'intervalle à 95% de OR=5.8, IC95% 2.3-18.1.

Les valeurs des taux d'enzymes associées au fonctionnement du foie ont également été évaluées chez les patients cancers positifs en hépatite E (Figure 25).



A: Non infectés, B: Infection en cours et C: Infection ancienne par l'hépatite virale E

Figure 25: Les taux d'ALT et d'ASAT chez les patients cancers avec et sans hépatite E

Nos résultats montrent des taux d'ALAT et ASAT significativement ($P=0.001$) élevés chez les patients infectés soit par une hépatite E ancienne ou récente, comparé aux patients sans hépatite E.

Tableau 7: Séroprévalence des marqueurs sérologiques de l'infection par le virus de l'hépatite E et caractéristiques socio-démographiques des patients.

| Caractéristiques | Cas (G3) (%) | | |
|-----------------------|-------------------|--|---|
| | | Témoins présentant une hépatite chronique (G2) (%) | Témoins sans signe d'affection hépatique (G1) (%) |
| Anti-VHE (%) | | | |
| | IgG | 28 (41.8) | 10 (14.9) |
| | IgM | 8 (11.9) | 17 (25.4) |
| Genre | | | |
| | | 21 (48.8) | 12 (27.9) |
| | | 7 (29.2) | 5 (20.8) |
| | Males, n=43 (%) | | 4 (9.3) |
| | Femeles, n=24 (%) | | 3 (12.5) |
| Sérologies | | | |
| | HBV(+), n=47 | 17 (36.2) | 12 (25.5) |
| | HCV(+), n=20 | 11 (55.0) | 8 (40.0) |
| Groupes d'ages | | | |
| | <20 | 0/5 (/) | 1/5 (20.0) |
| | 20-39 | 12/29 (41.3) | 5/28 (17.8) |
| | 40-59 | 6/16 (37.5) | 2/17 (11.8) |
| | ≥60 | 10/17 (58.8) | 1/16 (6.2) |

HBsAg: Antigène de surface du virus de l'hépatite B; Anti-VHC: Anticorps dirigé contre le virus de l'hépatite C; Anti-VHE: Anticorps dirigé contre le virus de l'hépatite E; IgG: Immunoglobuline de type G, IgM: immunoglobuline de type M; (G1): Patients sans cancer et sans hépatite B et C; (G2): Patients sans cancer mais positif en hépatite B et C.

III.1.2.4. Distribution des charges virales hépatite B et C chez les cas et les témoins 1.

Tous les échantillons positifs à l'antigène de surface (HBsAg) et à l'anti-VHC ont été analysés pour la charge virale (CV) hépatite B et C respectivement. La réplication virale a été détectée chez 93% (54/58) et 87% (20/23) des cas infectés par le VHB et VHC respectivement puis 67% (6/9) et 100% (3/3) des témoins correspondants. Les moyennes des charges virales dans les deux groupes des patients sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8: Les moyennes de charges virales VHB et VHC chez les cas et témoins 1

| Variables | Témoins | | | Cas | | |
|-------------------|---------|-----|-----------------------|-----|----|-----------------------|
| | No | % | Moyenne (log10 IU/ml) | No | % | Moyenne (log10 IU/ml) |
| Charge virale VHB | 6 | 67 | 5.7 | 54 | 93 | 6.3 |
| Charge virale VHC | 3 | 100 | 5.2 | 20 | 87 | 5.7 |

VHB, virus de l'hépatite B; VHC, virus de l'hépatite C; UI, Unité internationale.

Nos résultats montrent un taux de réplication significativement plus élevé chez les cas présentant les sérologies hépatite B positives comparé aux témoins sans cancer avec les moyennes de charges virales respectives de 6,3 log UI/ml et 5,7 log UI/ml. Les charges virales VHC ont été trouvées statistiquement identiques dans les deux groupes de patients.

Dans l'optique d'identifier le risque des hépatites occultes sur le CHC, les charges virales hépatites B ont également été quantifiées chez les patients présentant les sérologies HBsAg négatives. Le résultat a montré une forte prévalence de l'hépatite B occulte chez les patients diagnostiqués d'un carcinome hépatocellulaire au Cameroun (30.0%) comparé aux témoins sans aucun signe d'affection hépatique (6,7%). La moyenne d'âge des patients identifiés avec une hépatite B occulte était significativement élevée comparé à celle des patients cancers présentant une hépatite active $59,9 \pm 14,1$ vs $39,04 \pm 14,7$ ans, ce qui suggère une différence au niveau de la cinétique de progression vers le carcinome hépatocellulaire chez les patients occultes.

III.1.2.5. Identification de l'effet de la charge virale, les différents génotypes et mutations des virus de l'hépatite B et C sur le développement du CHC.

Dans le but d'identifier l'effet de la charge virale, les différents génotypes et mutations associés à l'infection par le VHB et VHC sur le développement du carcinome hépatocellulaire, un autre groupe de témoins a été inclus dans cette étude (témoins 2). Ce groupe était constitué des patients de sérologies hépatite B et C positives. Tout comme les

témoins sans aucun signe d'affection hépatique, les témoins hépatite B et C ont été appariés en sexe et en âge (± 5 ans) à des patients cancers du même statut sérologique. Sur les 58 cas répertoriés avec les sérologies hépatite B (HBsAg positive), seuls 54 ont été appariés en sexe et en âge à des témoins de sérologies hépatite B positives. Pour ce qui est du VHC, tous les 23 cas identifiés avec une sérologie positive ont été appariés en sexe et en âge (± 5 ans) à 23 témoins de même sérologie.

III.1.2.5.1 Influence de la charge virale VHB sur le développement du CHC

L'ADN du VHB a été détecté chez 93,10% (54/58) cas et 90,7% (49/54) témoins 2. On a par la suite procédé à la répartition des patients en divers intervalles de charge virale (Tableau 9).

Tableau 9: Identification du risque associé à l'augmentation de la CV hépatite B sur le développement du carcinome hépatocellulaire.

| Charge virale (UI/ml) | Cas (N=58) | Témoins (N=54) | OR 95% IC | P |
|-----------------------|------------|----------------|-----------------------|--------------|
| <10 | 3 | 5 | Référence | >0,05 |
| [10-1000[| 20 | 26 | 1,4(0,3-6,5) | =0,707 |
| [1000-10000[| 9 | 16 | 0,56(0,13-2,48) | =0,47 |
| [10000-100000[| 8 | 3 | 4,44(0,63-31,3) | =0,125 |
| $\geq 100\ 000$ | 17 | 4 | 6,67(1,1-40,4) | =0,03 |

CV, charge virale; OR, odd ratio; IC, intervalles de confiances.

Le Tableau 9 montre clairement que l'augmentation de la charge virale hépatite B est un facteur de risque fortement impliqué dans le développement du CHC. Ce risque est significativement accentué ou multiplié par 6 pour les charges virales de plus de 100 000 UI/ml. Ce qui suggère donc que la diminution du taux de la charge virale pourrait être un bon moyen de retarder la progression vers le CHC et divers autres complications hépatiques.

III.1.2.5.2 Influence de la charge virale hépatite C sur le développement du CHC

Le Tableau 10 présente le rôle de la charge virale hépatite C sur le développement du CHC. Sur les 23 cas et 23 témoins 2 avec la sérologie hépatite C positive, l'ARN a été détecté chez 86,9% et 82,6% des cas et témoins 2 respectivement. Il ressort du tableau 11 que le risque de progresser vers le CHC est étroitement lié à l'augmentation de la charge virale.

III.1.2.5.3 Influence des génotypes du VHB sur le développement du CHC

L'identification des différents génotypes a été faite chez les patients de charges virales détectables c'est-à-dire supérieure à 10 UI/ml. Le génotypage a été réalisé chez 42 cas et 44 témoins. Nos résultats montrent une co-circulation des génotypes A et E du virus de l'hépatite B chez les cas et les témoins. Le génotype A a été majoritairement trouvé chez les cas (83,3%) tandis que le génotype E a été majoritairement détecté chez les témoins (70,5%) (Figure 26). Dans la présente étude, tous les patients diagnostiqués avec le génotype A étaient du quasi sous génotype A3 (Qs-A3) qui est le nom donné aux anciens sous génotypes A3, A4 et A5 précédemment décrits.

Tableau 10: Identification du risque associé à l'augmentation de la CV hépatite C sur le développement du carcinome hépatocellulaire.

| Charge virale (UI/ml) | Cas (N=58) | Témoins (N=54) | OR 95% IC | P |
|-----------------------|------------|----------------|----------------------|--------------|
| <10 | 3 | 4 | Référence | >0,05 |
| [10-1000[| 1 | 5 | 0,3(0,3-4,4) | =0,39 |
| [1000-10000[| 2 | 4 | 0,8(0,9-7,7) | =0,87 |
| [10000-100000[| 4 | 3 | 2,2(0,3-17,6) | =0,45 |
| ≥100 000 | 13 | 8 | 3,6(0,6-20,3) | =0,21 |

CV, charge virale; OR, odd ratio; IC, intervalles de confiances.

III.1.2.5.4 Influence des génotypes du VHC sur le développement du CHC

Pour ce qui est de l'identification des différents génotypes du VHC qui circulent chez les cas et les témoins, l'identification a été faite dans deux régions différentes du virus: la région core et la région NS5B (Figure 27 et 28). Les résultats montrent une circulation des génotypes 1,2 et 4 à la fois chez les cas et les témoins avec une forte prédominance du génotype 4f chez les cas (66,7%) et du génotype 2 chez les témoins (60%) (Figure 27 et 28).

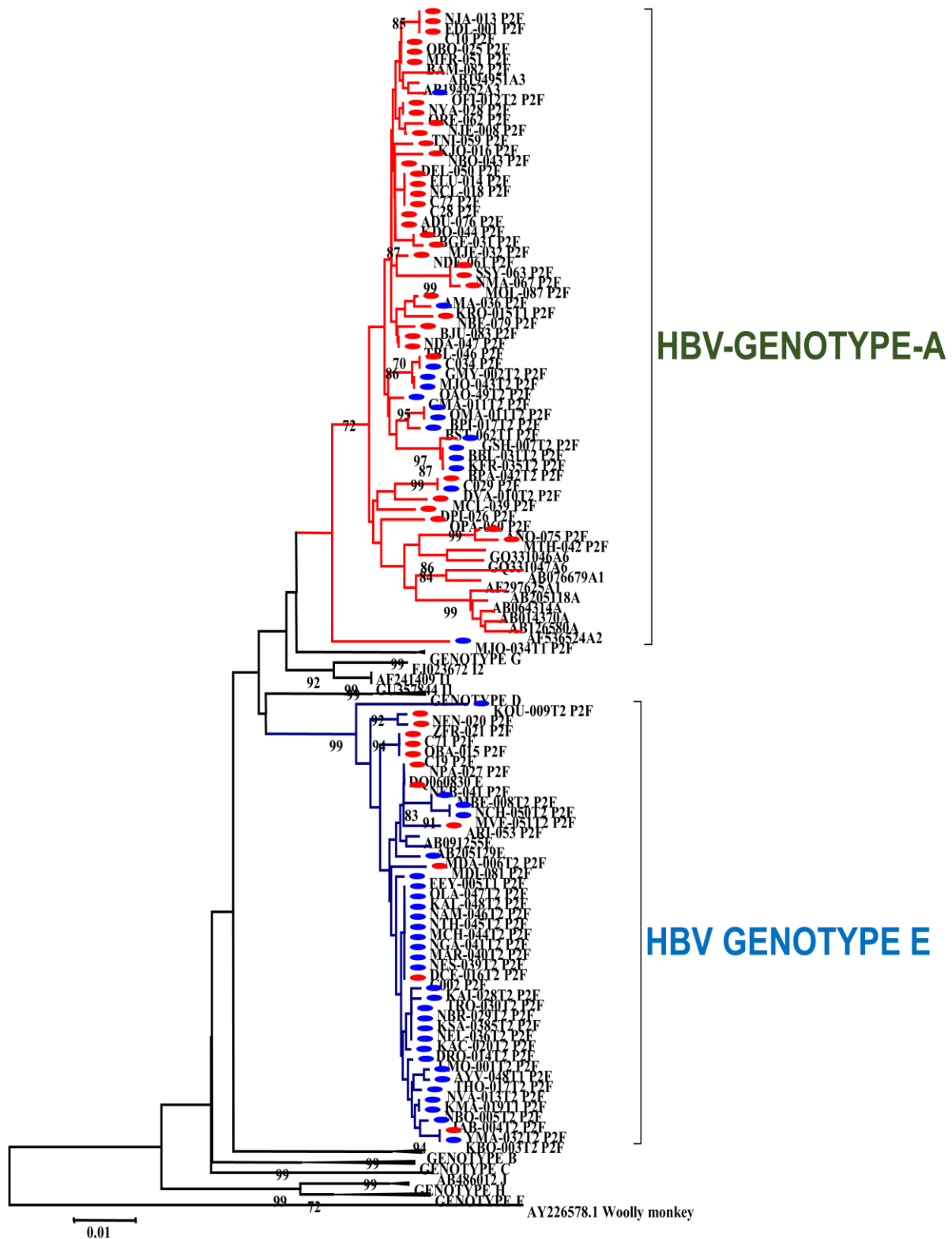


Figure 26: Arbre phylogénétique du VHB des cas et des témoins basé sur le gène S.

Cet arbre phylogénétique a été construit par la méthode du plus proche voisin et les distances génétiques ont été calculées par le modèle de Kimura 2 parameters. L'arbre phylogénétique a été construit à partir d'un alignement des séquences de référence de la région S du VHB. En rouge sont présentés a les patients cancer et en bleu les témoins.

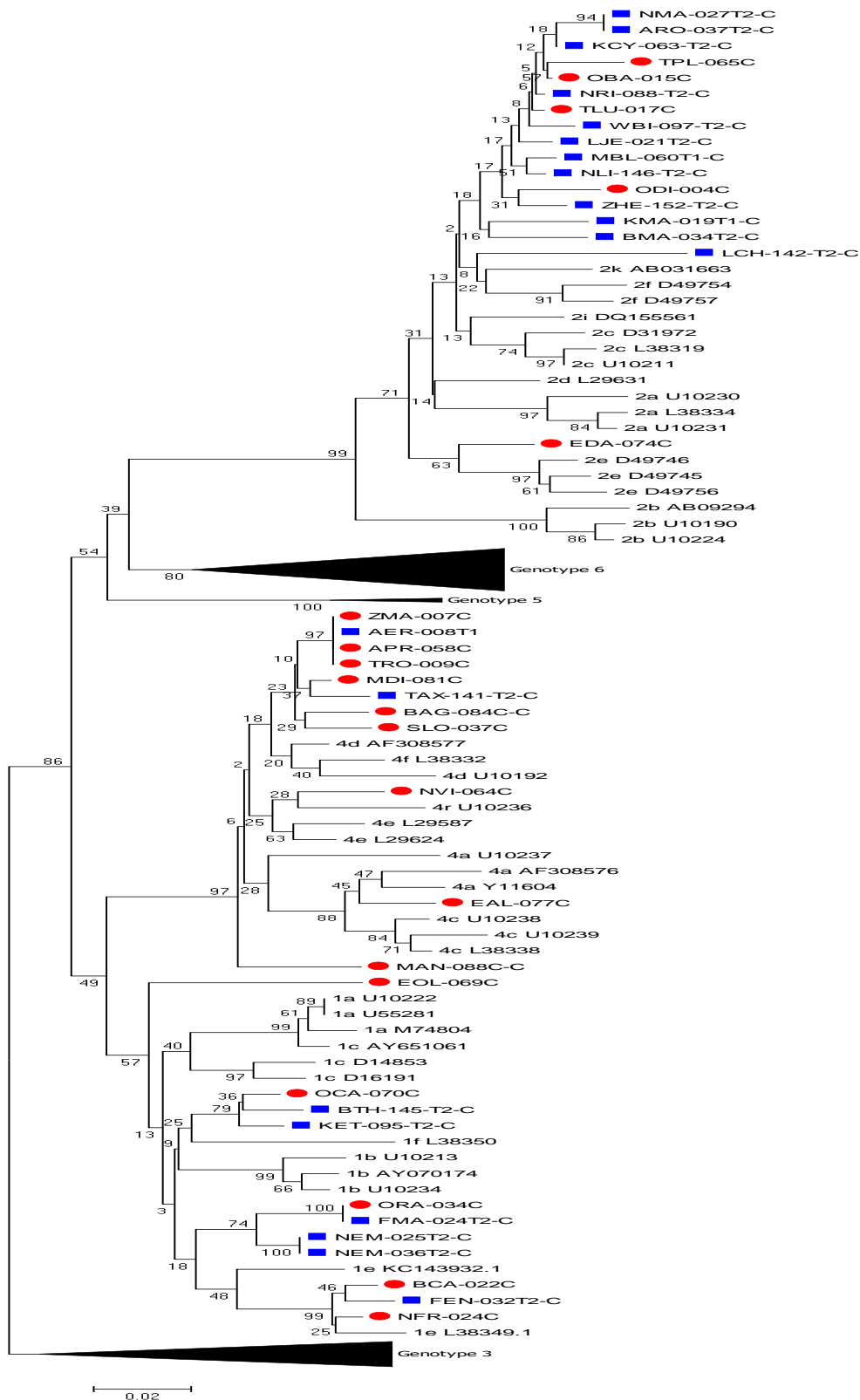


Figure 27: Arbre phylogénétique du VHC des cas et des témoins basé sur le gène capside.

Cet arbre phylogénétique a été construit par la méthode du plus proche voisin et les distances génétiques ont été calculées par le modèle de Kimura 2 parameters. L'arbre phylogénétique a été construit à partir d'un alignement des séquences de référence de la région capside du VHC. En rouge on a les patients cancer et en bleu les témoins.

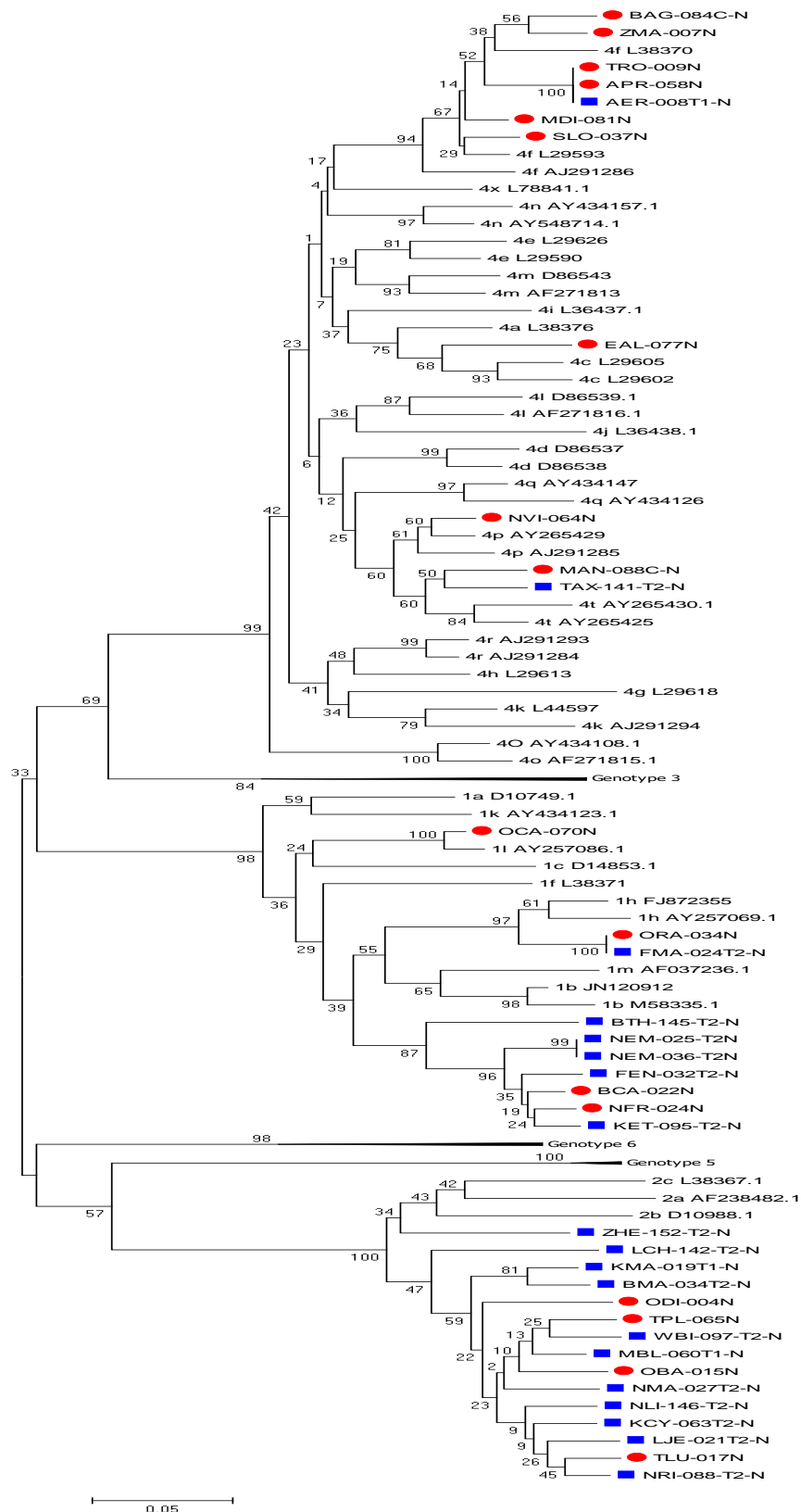


Figure 28: Arbre phylogénétique du VHC des cas et des témoins basé sur le gène NS5B.

Cet arbre phylogénétique a été construit par la méthode du plus proche voisin et les distances génétiques ont été calculées par le modèle de Kimura 2 parameters. L'arbre phylogénétique a été construit à partir d'un alignement des séquences de référence de la région NS5B du VHC. En rouge on a les patients cancer et en bleu les témoins.

III.1.2.5.5 Influence des mutations du VHC sur le développement du CHC

Les séquences des gènes capsidique et NS5B du VHC ont été analysées chez les cas et les témoins dans l'optique d'identifier le risque associé aux mutations virales sur le développement du carcinome hépatocellulaire. Pour ce qui est du gène capsidique, diverses mutations ont été répertoriées (Figure 29, 30 et 31).

| Position | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 2b U10190 | K | T | K | R | N | T | N | R | R | P | Q | R | L | G | V | R | T | T | R | K | T | S |
| EAL-077C | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| EDA-074C | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| EOL-069C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | M | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| MDI-081C | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| BAG-084C-C | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| MAN-088C-C | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| NVI-064C | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| OCA-070C | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| TPL-065C | . | H | Q | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | A |
| TRO-009C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| APR-058C | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| BCA-022C | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| NFR-024C | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| OBA-015C | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| ODI-004C | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| ORA-034C | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| SLO-037C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| TLU-017C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| ZMA-007C | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| AER-008T1 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| KMA-019T1 | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | V | . | . | . | . |
| MBL-060T1 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| LJE-021T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| NEM-025T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| BMA-034T2 | E | N | Q | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| NMA-027T2 | E | N | Q | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| FEN-032T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | K | . | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| NEM-036T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| FMA-024T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| ARO-037T2 | E | N | Q | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| WBI-097-T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| KET-095-T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| NRI-088-T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| LCH-142-T2 | . | . | . | . | . | . | . | P | . | . | . | . | . | . | . | . | A | A | . | . | . | . |
| TAX-141-T2 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| NLI-146-T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| KCY-063-T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| BTH-145-T2 | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |

Figure 29: Séquences des acides aminés du gène capsidique du VHC des cas et des témoins

En jaune figurent les zones variables et les positions indiquent les sites qui sont mutés. Les codes C renvoient aux cas et les codes T1 et T2 sont les témoins tandis que 2b U10190 indique le génotype et « l'accèsion number » de la séquence de référence utilisée.

| Position | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 |
|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 2b U10190 | R | S | T | G | K | P | W | G | K | P | G | Y | P | W | P | L | Y | G | N | E | G | C | G |
| EAL-077C | . | . | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| EDA-074C | . | P | . | . | R | S | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| EOL-069C | . | P | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | S | . | . |
| MDI-081C | Q | T | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| BAG-084C | . | . | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| MAN-088C | . | P | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NVI-064C | P | P | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| OCA-070C | . | P | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| TPL-065C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| TRO-009C | . | T | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| APR-058C | . | T | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| BCA-022C | . | P | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NFR-024C | Q | P | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| OBA-015C | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| ODI-004C | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| ORA-034C | . | . | E | . | R | T | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| SLO-037C | . | T | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| TLU-017C | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| ZMA-007C | . | T | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| AER-008T1 | . | T | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| KMA-019T1 | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| MBL-060T1 | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| LJE-021T2 | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| NEM-025T2 | . | P | E | . | R | T | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| BMA-034T2 | . | P | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| NMA-027T2 | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| FEN-032T2 | . | P | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEM-036T2 | . | P | E | . | R | T | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| FMA-024T2 | . | . | E | . | R | T | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| ARO-037T2 | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| WBI-097-T2 | . | . | . | . | . | S | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| KET-095-T2 | Q | P | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NRI-088-T2 | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| LCH-142-T2 | . | A | . | . | . | S | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| TAX-141-T2 | Q | T | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NLI-146-T2-C | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| KCY-063-T2 | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . |
| BTH-145-T2 | Q | P | E | . | R | S | . | A | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |

Figure 30: Séquences des acides aminés du gène capsid du VHC des cas et des témoins

En jaune figurent les zones variables et les positions indiquent les sites qui sont mutés. Les codes C renvoient aux cas et les codes T1 et T2 sont les témoins tandis que 2b U10190 indique le génotype et « l’accession number » de la séquence de référence utilisée.

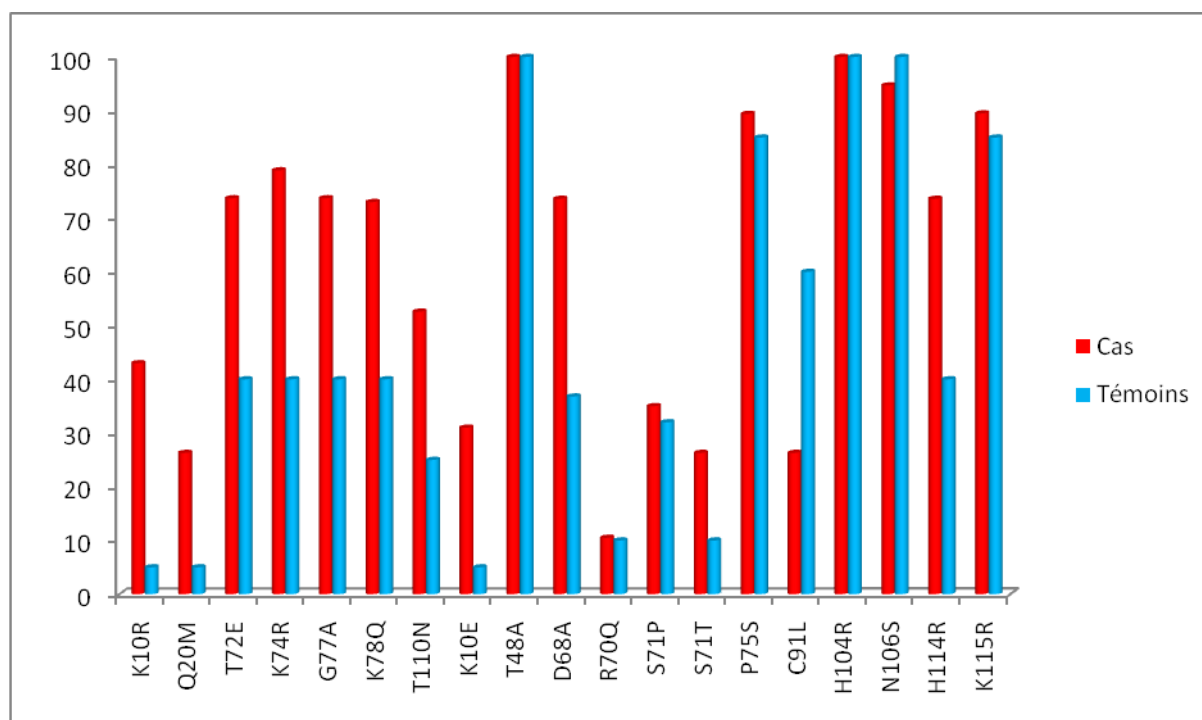


Figure 31: Fréquence des mutations nucléotidiques du gène capside du virus de l'hépatite C chez les cas et les témoins.

Les positions 10, 20, 72, 74, 77, 78, 110, 48, 68, 70, 71, 75, 91, 104, 106, 114 et 115 indiquent les sites mutés.

Il ressort de la figure 31 qui est le récapitulatif des figures 29 et 30 que, les mutations K10R (43% et 5%), Q20M (26,3% vs 5%), T72E (73,7% vs 40%), K74R (78,9% vs 40%), G77A (73,7% vs 40%), K78Q (73,7% vs 40%) et T110N (52,6% vs 25%) ont été fréquemment détectées chez les patients diagnostiqués d'un CHC comparé aux témoins 2 hépatite C positif sans cancer. Ce qui suggère que ces mutations pourraient être des facteurs accentuant la progression vers le cancer chez les patients hépatite C positifs.

En ce qui concerne les mutations qui affectent le gène NS5B, diverses mutations ont également été répertoriées (Figure 32, 33 et 34).

| Position | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| AJ291286.4f | E | V | Y | Q | C | C | D | L | E | P | E | A | R | K | V | I | S | A |
| EAL-077N | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | T | . |
| MDI-081N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . |
| BAG-084C-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . |
| MAN-088C-N | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | D | T | . | . | . | . | T | . |
| NVI-064N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | D | T | . | . | . | . | . | . |
| OCA-070N | S | L | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | V | A | . | K | S |
| TPL-065N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | E | . | . | . | T | A | . | Q | S |
| TRO-009N | D | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | T | . |
| APR-058N | D | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | T | . |
| BCA-022N | S | I | . | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | V | A | . | K | S |
| NFR-024N | S | I | . | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | V | A | . | K | S |
| OBA-015N | S | I | . | . | A | . | T | . | P | E | . | . | . | V | A | . | H | S |
| ODI-004N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | E | . | . | . | T | A | . | H | S |
| ORA-034N | S | I | . | . | S | . | . | . | D | . | D | . | . | . | A | . | A | S |
| SLO-037N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . |
| TLU-017N | S | I | . | . | A | . | S | . | S | E | . | . | . | T | A | . | H | S |
| ZMA-007N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . |
| AER-008T1-N | D | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | T | . |
| KMA-019T1-N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | E | . | . | . | T | A | . | H | S |
| MBL-060T1-N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | E | . | . | . | T | A | . | H | S |
| BMA-034T2-N | S | I | . | L | A | . | S | . | P | E | . | . | . | T | A | . | H | S |
| LJE-021T2-N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | E | . | . | . | T | A | . | H | S |
| NEM-025-T2N | S | I | . | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | V | A | . | K | S |
| FMA-024T2-N | S | I | . | . | S | . | . | . | D | . | D | . | . | . | A | . | A | S |
| NMA-027T2-N | S | I | . | . | A | S | S | . | P | E | . | . | . | T | A | . | H | S |
| FEN-032T2-N | S | I | . | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | V | A | . | K | S |
| NEM-036-T2N | S | I | . | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | V | A | . | K | S |
| KCY-063T2-N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | E | . | . | . | T | . | . | H | S |
| LCH-142-T2-N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | D | D | . | . | . | A | . | H | S |
| NRI-088-T2-N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | D | . | . | . | A | A | . | H | S |
| WBI-097-T2-N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | E | . | . | . | S | A | . | H | S |
| BTH-145-T2-N | S | L | . | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | T | A | . | K | S |
| NLI-146-T2-N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | E | . | . | . | T | A | . | H | S |
| ZHE-152-T2-N | S | I | . | . | A | . | S | . | P | E | . | . | . | T | A | . | H | S |
| TAX-141-T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | D | T | . | . | . | . | K | . |
| KET-095-T2-N | S | I | . | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | V | A | . | K | S |

Figure 32: Séquences des acides aminés du gène NS5B du VHC des cas et des témoins

En jaune figurent les zones variables et les positions indiquent les sites qui sont mutés. Les codes C renvoient aux cas et les codes T1 et T2 sont les témoins tandis que le code « AJ291286.4f » indique le génotype et « l’accession number » de la séquence de référence utilisée

| Position | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | |
|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| AJ291286.4f | L | T | E | R | L | Y | V | G | G | P | M | H | N | S | R | G | D | L | C | G | Y | R | R | C | R | A | S | G | V | Y | |
| EAL-077N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | K | . | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| MDI-081N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| BAG-084C-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | . | . | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| MAN-088C-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | K | . | . | . | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| NVI-064N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | K | . | . | . | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| OCA-070N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | T | . | . | K | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| TPL-065N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| TRO-009N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| APR-058N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| BCA-022N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | T | . | . | . | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| NFR-024N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | T | . | . | K | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| OBA-015N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| ODI-004N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Q | . | . | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| ORA-034N | . | . | . | . | . | . | I | . | . | . | L | T | . | . | . | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| SLO-037N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| TLU-017N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| ZMA-007N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | . | . | K | . | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| AER-008T1-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | K | . | H | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| KMA-019T1-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | . | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| MBL-060T1-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| BMA-034T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | . | . | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| LJE-021T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| NEM-025-T2N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | T | . | . | . | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| FMA-024T2-N | . | . | . | . | . | . | I | . | . | . | L | T | . | . | . | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| NMA-027T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| FEN-032T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | T | . | . | . | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| NEM-036-T2N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | T | . | . | . | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| KCY-063T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| LCH-142-T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | . | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| NRI-088-T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| WBI-097-T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| BTH-145-T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | T | . | . | K | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| NLI-146-T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | G | K | . | Q | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| ZHE-152-T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | K | . | Q | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |
| TAX-141-T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | . | . | K | . | . | . | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | . | F | |
| KET-095-T2-N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | T | . | . | K | . | E | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | |

Figure 33: Séquences des acides aminés du gène NS5B du VHC des cas et des témoins

En jaune figurent les zones variables et les positions indiquent les sites qui sont mutés. Les codes C renvoient aux cas et les codes T1 et T2 sont les témoins tandis que le code « AJ291286.4f » indique le génotype et « l'accession number » de la séquence de référence utilisée

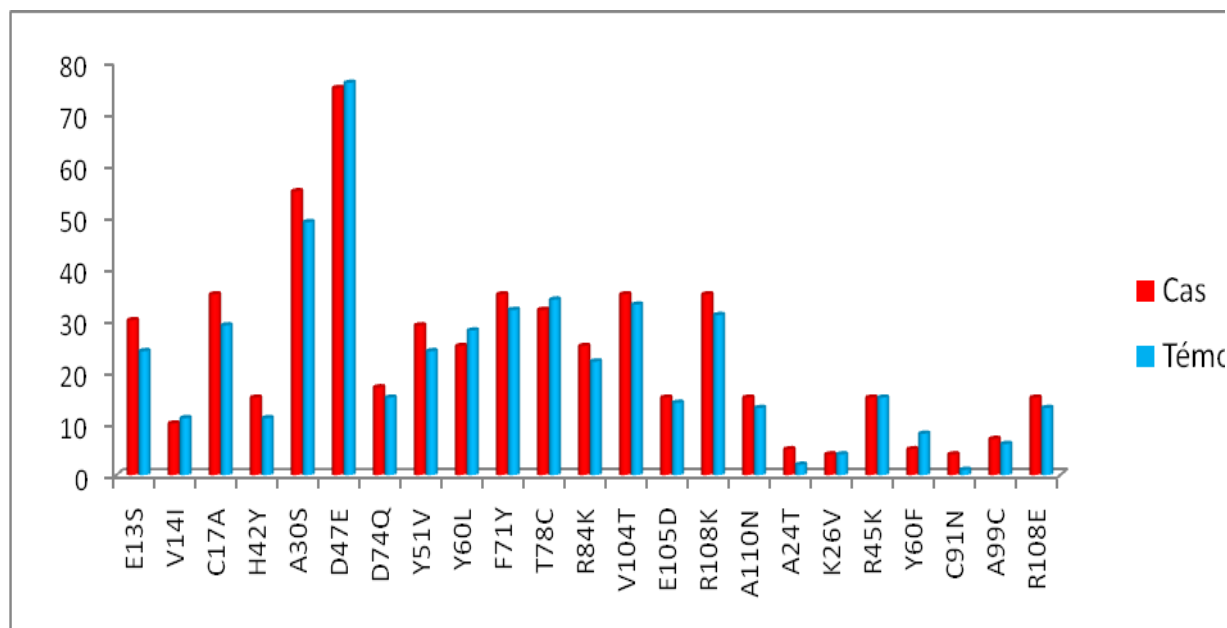


Figure 34: Fréquence des mutations nucléotidiques du gène NS5B du virus de l’hépatite C chez les cas et les témoins.

Les positions 13, 14, 17, 42, 30, 47, 74, 51, 60, 71, 78, 84, 104, 105, 24, 26, 45, 60, 91, 99 et 108 indiquent les sites mutés.

Il ressort de la figure 34 qui est le condensé des figures 32 et 33 que diverses mutations ont été à la fois détectées chez les cas et les témoins mais nous ne notons aucune différence entre les cas et les témoins sur la portion du génome amplifiée dans la présente étude. On a par la suite investigué le risque associé à la présence des mutations du gène core sur le développement du carcinome hépatocellulaire. Les résultats issus de cette analyse sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11: Risque associé aux mutations affectant les gènes NS5B, Capside et CHC.

| Mutations par gène | Pourcentages | | Odds ratio (IC 95%) | Seuil de significativité |
|--------------------|--------------|---------|---------------------|--------------------------|
| | Cas | Témoins | | |
| Capside | | | | |
| K10R | 43 | 5 | 13,8 (1,5-125,6) | 0,006 |
| Q20M | 26,3 | 5 | 6,79 (0,7-64,72) | 0,065 |
| T72E | 73,7 | 40 | 4,2 (1,08-16,32) | 0,034 |
| K74R | 78,9 | 40 | 5,6 (1,3-23,27) | 0,13 |
| G77A | 73,7 | 40 | 4,2 (1,08-16,3) | 0,034 |
| K78Q | 73,7 | 40 | 4,2 (1,08-16,3) | 0,034 |
| T110N | 52,6 | 25 | 3,3 (0,86-12,9) | 0,076 |

Le Tableau 11 ci-dessus montre une forte implication de toutes ces mutations sur le développement du carcinome hépatocellulaire.

III.1.2.6.5 Influence des mutations du VHB sur le développement du CHC

Dans l'optique d'identifier l'effet des mutations du VHB sur le développement du carcinome hépatocellulaire, diverses mutations ont été analysées en se servant de la méthode d'analyse mutationnelle décrite par (Bell et Kramvis, 2013). Les mutations Précore/Core/promoteur basal du core (BCP) et Pré S sont résumées dans les Figures 49 et 50 respectivement. Les mutations C1766T, T1768A, G1862T/A du gène Précore/Core/BCP du VHB (Figure 35) n'ont été identifiées que chez les patients cancers.

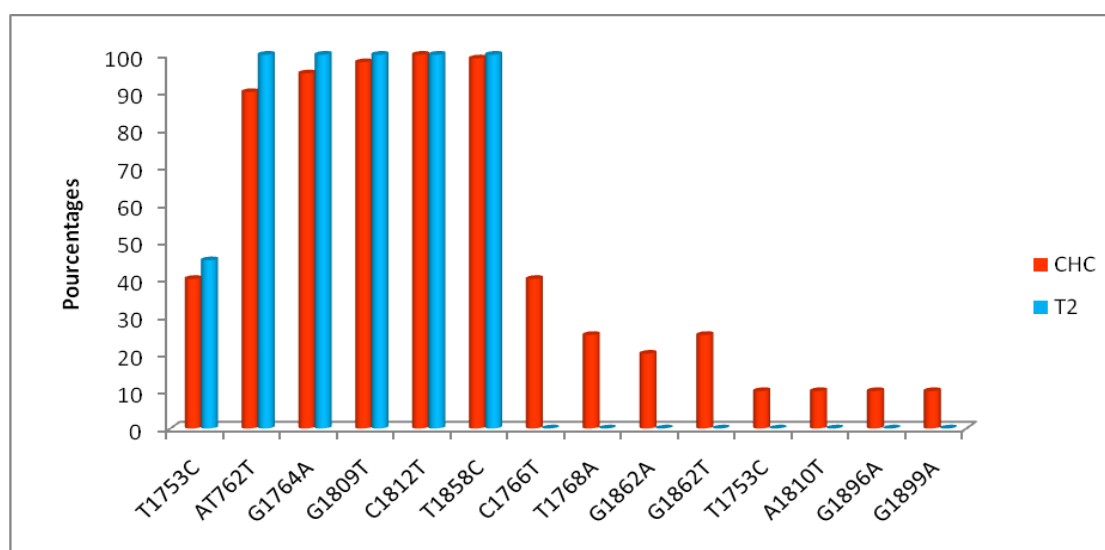


Figure 35: Fréquence des mutations nucléotidiques du gène Précore/C/BCP du virus de l'hépatite B chez les cas et les témoins.

Les positions 1753, 1762, 1764, 1809, 1812, 1858, 1766, 1768, 1862, 1896 et 1899 indiquent les sites mutés.

Pour ce qui est des mutations au niveau du gène Pré-S du VHB, la Figure 36 ci-dessous montre une forte prédominance des mutations C3116T, C2875A et G2951C chez les cas, comparé aux témoins.

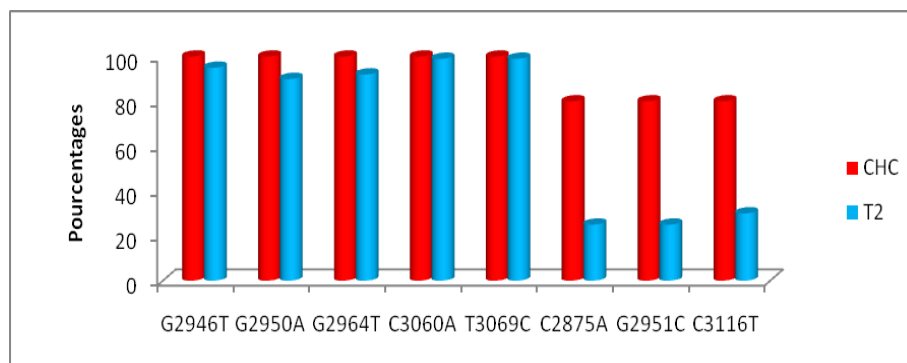


Figure 36: Fréquence de détection des mutations nucléotidiques du gène Pré-S du virus de l’hépatite B chez les cas et les témoins.

Les positions 2946, 2950, 2964, 3060, 3069, 2875, 2951, et 3116 indiquent les sites mutés.

On a par la suite observé les mutations associées au VHB au niveau des acides aminés. Les figures 37 et 38 présentent les différentes mutations trouvées au niveau du fragment preCore/core.

| Position | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AB194949 A3 | A | T | L | C | W | G | E | L | M | T | L | A | T | W | V | G | N | N | L | Q |
| C8C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | E |
| C15C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C16C | . | V | . | . | . | . | . | . | . | S | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . |
| C18C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C26C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C27C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . |
| C28C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | E |
| C32C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C43C | . | V | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | S | . | . | . | H | . | . | . |
| C46C | . | I | . | . | . | . | D | . | . | N | . | G | . | . | . | . | A | . | . | D |
| C47C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C51C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C53C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C57C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C59C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | D |
| C67C | . | I | . | . | . | . | D | V | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | E |
| C71C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C76C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | S | V | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C79C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | D |
| T1062C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| T2002C | . | I | . | . | . | . | D | V | . | N | . | . | . | . | . | . | H | . | . | E |
| T2005C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| T2007C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| T2010C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | S | V | . | . | . | . | . | . | . | . | E |
| T2011C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| T2012C | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |

Figure 37: Séquences en acide aminés du gène précore/Core du VHB des cas et des témoins

En jaune figurent les sites qui ont varié; la position correspond au site qui a muté et AB191949 A3 est la séquence de référence utilisée.

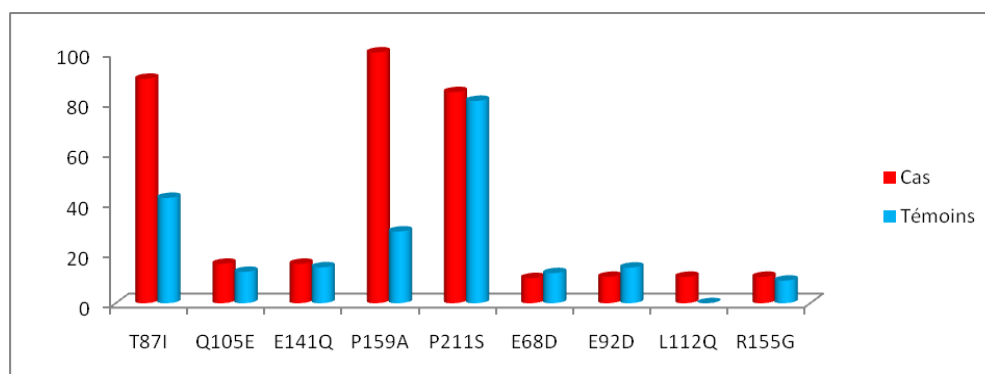


Figure 38: Fréquence de détection des mutations nucléotidiques du gène Précore/core du virus de l'hépatite B chez les cas et les témoins.

Les positions 87, 105, 141, 3060, 159, 2875, 211, 68, 92, 112 et 155 indiquent les sites mutés.

Il ressort de la figure 38 que parmi les positions nucléotidiques décrites comme point chaud pour le fragment précore/Core du VHB à savoir les positions 87, 97, et 130 seule la position 87 a été trouvée fréquemment modifiée, avec une très forte prévalence de la mutation T87I dans les deux groupes de patients. Cependant, les mutations P159A et P211S ont également été fortement détectées.

III.1.2.6.7 Altérations génétiques associées au développement du CHC

Diverses altérations génétiques associées au développement du carcinome hépatocellulaire ont également été analysées dans la présente étude. Avant l'identification des différentes altérations, la qualité du matériel génétique contenu dans nos éluats a d'abord été évalué (Figure 39).

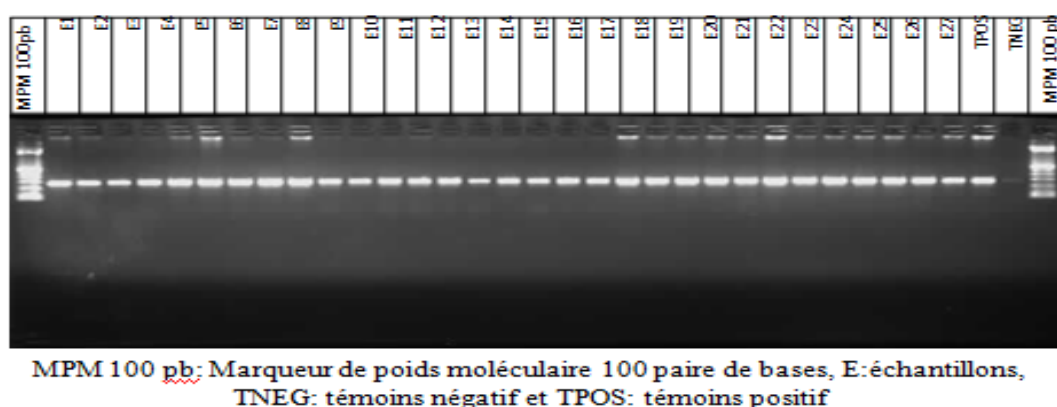


Figure 39: Photo du gel permettant d'identifier la qualité des ADN par PCR bêta-globine.

Notre résultat présente les échantillons tous positifs cela suggère une extraction avec des bonnes qualités d'ADN.

III.1.2.6.7.1 Quantification du taux d'ADN mitochondrial chez les cas et les témoins

La figure 40 présente les taux d'ADN mitochondriaux entre les cas et les différents types de témoins.

On note des taux d'ADN mitochondriaux significativement plus élevés chez les témoins 1 ne présentant aucune affection hépatique comparé aux patients présentant un carcinome hépatocellulaire ($p=0,03$). Le même constat a également été fait par comparaison avec les patients de sérologies hépatite B et C positives.

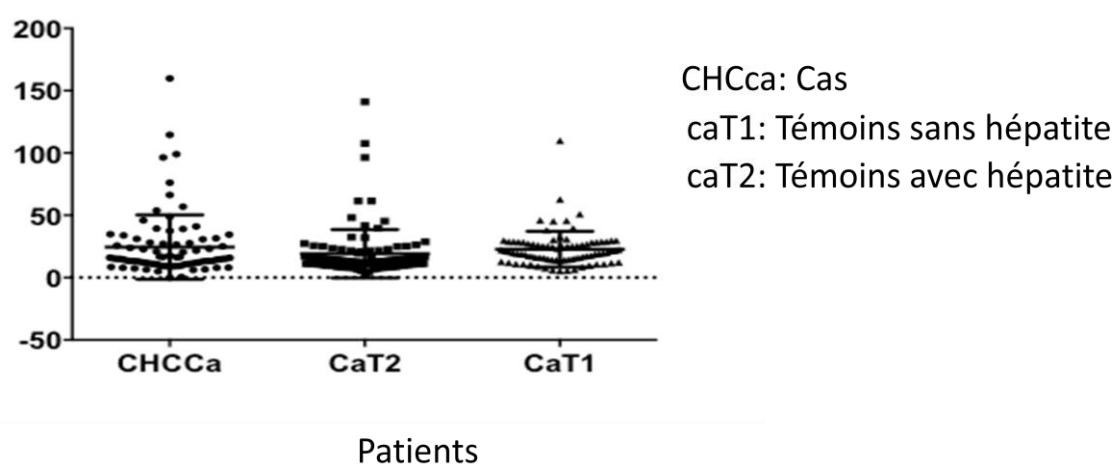


Figure 40: Les taux d'ADN mitochondriaux chez les cas, les témoins 1 et les témoins 2.

III.1.2.6.7.2 Haplogroupes mitochondriaux comme facteurs de susceptibilité au CHC.

La figure 41 présente la répartition des différents haplogroupes mitochondriaux chez les cas et les témoins.

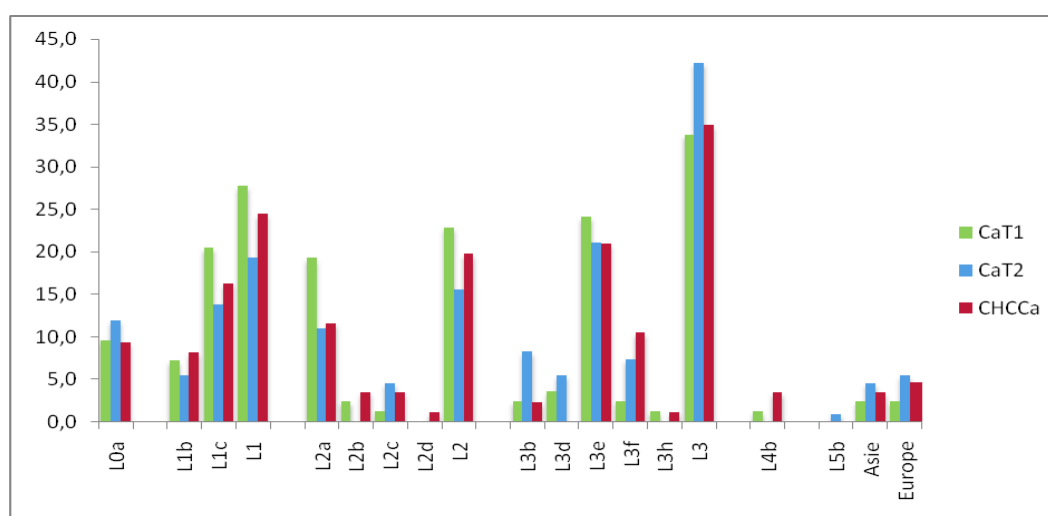


Figure 41: Représentation des différents haplogroupes mitochondriaux chez les cas (CHCCa), les témoins 1 (caT1) et les témoins 2 (caT2).

Il ressort de cette figure que les haplogroupes mitochondriaux qui circulent sont de type L (L0, L1, L2, L3, L4 et L5). Nos résultats ne montrent pas de différence statistique entre les différents sous groupes de l'haplogroupe L pour les trois groupes de patients. Ce qui nous amène à penser qu'au Cameroun, les haplogroupes mitochondriaux ne sont pas associés au développement du CHC et ne peuvent donc constituer un marqueur prédictif de développement tumoral.

III.1.2.6.7.3 Influence du polymorphisme mono nucléotidique du codon 72 du gène p53 sur le développement du CHC (SNP R72P).

Dans le but d'évaluer l'influence du polymorphisme SNP R72P sur le développement du CHC, les fréquences des génotypes proline-proline (PP), arginine-arginine (RR) et proline-arginine (RP) ont été déterminées dans la présente étude (Figure 42).

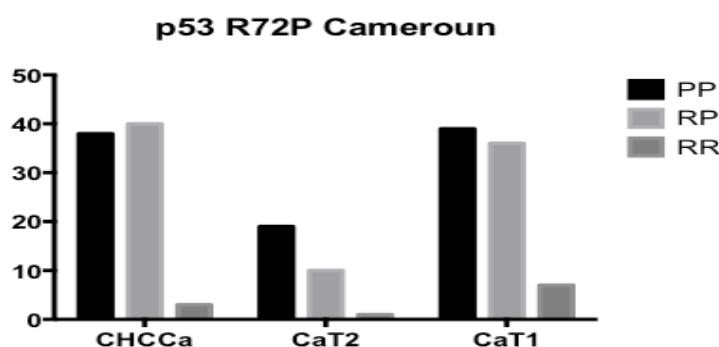


Figure 42: Fréquences de détection des différents génotypes du polymorphisme mononucléotidique du codon 72 du gène p53 chez les cas (CHCca), les témoins 1 (caT1) et les témoins 2 (caT2).

Il ressort dans cette figure qu'environ 38% des patients CHC sont homozygotes proline, 42% de ces mêmes patients sont hétérozygotes proline et arginine et 5% sont homozygotes arginine. Ce qui donne une fréquence de l'allèle variant arginine d'environ 23%. Parallèlement, dans la population témoin 1, 40% des patients sont homozygotes proline, 38% sont hétérozygotes proline et arginine et environ 10% sont homozygotes arginine. Ceci donne une fréquence de l'allèle variant arginine d'environ 25%.

On ne note aucune différence statistiquement significative entre les cas et les T1 sur les allèles variant arginine et proline. Avec une très forte prévalence de l'allèle proline. Nos résultats montrent que la SNP R72P pourrait ne pas être un facteur de susceptibilité au CHC chez les patients Camerounais.

III.1.2.6.7.4 Rôle de la mutation R249S du gène p53 sur le développement du CHC.

Les taux de détection de la mutation R249S des cas et des témoins sont présentés dans les figures 43 et 44. On note une très forte prédominance de la mutation R249S chez les cas par comparaison aux témoins sans cancer. Avec les pourcentages de gouttelettes informatives respectives de 43% et 26% pour les cas et les témoins. Nos résultats suggèrent que la mutation R249S pourrait être un bon marqueur diagnostique pour le dépistage et le suivi des patients de sérologies positives vis à vis des hépatites virales B et/ou C à risque.

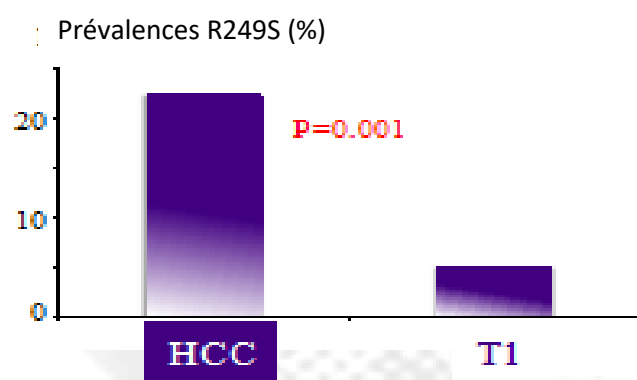


Figure 43: Fréquences de la mutation R249S chez les cas et les témoins.

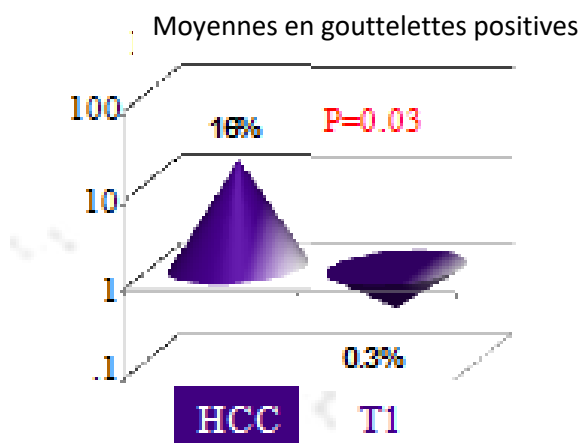


Figure 44: Fréquences de la mutation R249S chez les cas et les témoins.

III.2 DISCUSSION

Dans la présente étude nous nous sommes fixés pour objectif de déterminer les différents types de cancers primitifs du foie diagnostiqués au Cameroun, d'identifier l'étiologie virale des cancers primitifs au Cameroun et d'étudier certains facteurs génétiques associés à ces tumeurs.

Tout cancer découle d'une prolifération anarchique et incontrôlée des cellules. Cette prolifération peut être locale ou primitive avant de progresser vers les organes voisins via la circulation sanguine et/ou lymphatique. Le foie est un organe constitué de plusieurs types de cellules et chaque type de cancer primitif découle des cellules à travers lesquelles le cancer s'est développé (Farazi et DePinho, 2006). On dénombre différents types de cancers primitifs du foie (CPF) mais le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente le type le plus récurrent car diagnostiqué dans 80 à 90% des cas dans le globe (Ferlay *et al.*, 2015; Forner *et al.*, 2012; J. Gao *et al.*, 2012).

L'incidence des différents types de CPF diagnostiqués au Cameroun a été évaluée à travers une étude rétrospective sur une période de dix ans qui allait de Janvier 2004 à Janvier 2013. Cette partie du travail a été faite par analyse des données de toutes les biopsies hépatiques disponibles au Service d'Anatomie et Pathologie du Centre Pasteur du Cameroun. C'est la première revue réalisée dans ce sens car, excepté le carcinome hépatocellulaire, l'incidence des autres types de CPF restait méconnue au Cameroun et en Afrique Centrale.

Une biopsie hépatique est un examen qui consiste à prélever au moyen d'une aiguille une toute petite partie de la zone anormale du foie afin d'établir ou de confirmer un diagnostic fiable sur une pathologie soupçonnée (Rockey *et al.*, 2009; Siegel, Silas, Suriawinata et van Leeuwen, 2005; Tannapfel, Dienes et Lohse, 2012). Dans la présente étude, un total de 360 biopsies hépatiques a été analysé et les résultats obtenus révèlent l'existence de deux types de CPF à savoir le carcinome hépatocellulaire (CHC) et d'hépatoblastome avec une forte prévalence du CHC 98,2%. Nos résultats sur la prédominance du carcinome hépatocellulaire (CHC) s'identifient à ceux de (Kaczynski, Hansson et Wallerstedt, 1996) dont l'étude avait dénoté une forte incidence du CHC dans une étude rétrospective réalisée sur les patients Suédois. Ils s'apparentent également à ceux de (Chassagne *et al.*, 2016) qui ont mené une étude similaire sur les patients Cambodgien. La

forte prédominance du CHC pourrait s'expliquer dans un premier temps par l'hyper endémicité des hépatites virales B et C au Cameroun, car ces deux virus représentent les principaux facteurs associés au développement de ce type de CPF. Cette forte prédominance du CHC peut également se justifier par le climat chaud et sec du Cameroun très propice à la croissance des mycotoxines, autres facteurs fortement associés au développement du CHC.

La partie prospective de cette étude a montré une très forte prédominance des patients originaires de la région du centre. Cette forte représentativité pourrait se justifier au fait que les recrutements ont été effectués dans l'un des principaux sites de référence de la région du centre.

Dans plusieurs zones du globe, la survenue du carcinome hépatocellulaire est étroitement liée à l'augmentation de l'âge (Bahri *et al.*, 2011; Bosch, Ribes, Cléries et Díaz, 2005; Bosch, Ribes, Díaz et Cléries, 2004; El-Serag, 2007). Notre étude sur la partie prospective montre une moyenne d'âge de 46 ans chez les patients cancers. Cette moyenne est très faible comparé aux moyennes d'âges reportées dans les études menées en Afrique du Nord et dans les pays développés où les moyennes d'âges sont généralement comprises entre 60 et 65 ans (Acharya, 2014; Bahri *et al.*, 2011; Bosch *et al.*, 2004). Nos résultats s'apparentent à ceux reportés dans les quelques études descriptives menées jusqu'à présent sur le CHC au Cameroun ; de même, ils sont similaires à ceux d'une étude conduite sur les patients infectés par les hépatites chroniques B et ou C menée au Gabon (Perret *et al.*, 2008a). Des résultats similaires ont également été reportés dans diverses études menées en Afrique de l'Ouest dans les pays tels que le Nigéria (Echejoh *et al.*, 2008), la Gambie (Mbotto, Davies-Russell, Fielder et Jewell, 2005) et le Ghana (Asmah *et al.*, 2014). Cependant, nos résultats sont opposés à ceux d'une étude multicentrique conduite en Afrique du Nord (Bahri *et al.*, 2011). Ce qui suggère dans un premier temps la stabilité associée au développement du CHC depuis des décennies; nos résultats suggèrent également une progression similaire du CHC dans tous les pays de l'Afrique Sub-saharienne.

La détermination du sexe ratio a révélé une forte prédominance masculine dans la présente étude avec le ratio de 2,3 en faveur des hommes. Des ratios similaires ont également été reportés en Afrique de l'Est (2,4); de l'Ouest (2,2) et du Sud (2,3). Cette forte prédominance a également été identifiée dans diverses régions du globe comme corrélée à la prise excessive d'alcool chez les individus de sexe masculin (Donato *et al.*, 2002; Hutchinson, Bird et Goldberg, 2005; Mennen *et al.*, 2000).

Le carcinome hépatocellulaire comme tous les cancers découle de l'interaction entre divers types de carcinogènes. Il survient dans la majorité des cas sur un foie endommagé suite à l'infection par les virus des hépatites virales B et/ou C ou une inflammation due à une consommation excessive d'alcool (El-Serag, 2011b, 2012b; J. Gao *et al.*, 2012). Dans la présente étude, l'effet associé à l'infection par les virus des hépatites B, C et la coïnfection hépatite B/Delta a été évalué. Les résultats obtenus montrent que tous ces trois virus sont fortement détectés chez les patients Camerounais diagnostiqués d'un CHC comparé aux témoins ne présentant aucun signe d'affection hépatique. Les prévalences au sein des deux groupes de patients ont présenté des différences statistiquement significatives avec les valeurs de 65,9%, 26% et 41,1% pour l'hépatite B, C et D respectivement chez les cas et 10,6%, 3,5% et 1,2% chez les témoins sans aucun signe d'affection hépatique et sans carcinome hépatocellulaire.

Pour ce qui est de l'infection par le virus de l'hépatite B, les études antérieures menées dans d'autres groupes de patients tels que les donneurs de sang, les femmes enceintes et le personnel de santé ont également révélé une forte endémicité de cette infection avec les prévalences respectives de 10%, 20% et 33%. Nos résultats sont identiques à ceux des données reportés au Gabon, et divers pays de l'Afrique de l'Ouest tels que le Niger (73%), le Sénégal (63%) la Gambie (60%) et le Nigeria (61%) (Cenac *et al.*, 1995; Coursaget *et al.*, 1984; Perret *et al.*, 2008b; Umoh *et al.*, 2011). Cette observation confirme que l'hépatite B est le principal facteur de risque associé au développement du CHC et que son rôle est identiquement réparti dans divers pays d'Afrique Sub-saharienne.

L'hépatite C a été détecté positif chez 26% des patients cancers et 3% des témoins ; des prévalences significativement élevées ont été reportées chez les patients cancers dans diverses études réalisées en Afrique noire (Cenac *et al.*, 1995; Umoh *et al.*, 2011). Cependant, nos résultats diffèrent de ceux des études réalisées en Afrique du Nord où c'est plutôt l'hépatite C qui est plus prévalent comparé à l'hépatite virale B (Bahri *et al.*, 2011). De même, nos résultats sont également différents de ceux de Perret et son équipe; ces derniers avaient reporté des prévalences identiques pour les deux virus (Perret *et al.*, 2008b).

Très peu de données sont disponibles sur le rôle de l'hépatite D en Afrique Subsaharienne. Dans la présente étude, l'hépatite Delta a été significativement détectée chez les patients cancer de sérologie hépatite B positive comparé aux témoins de même sérologie. Nos résultats s'apparentent à ceux disponibles chez les patients souffrant des hépatites

chroniques au Cameroun (Asmah *et al.*, 2014; Foupouapouognigni *et al.*, 2011). Cependant, ils sont complètement différents des données reportées au Nigéria dans une étude conduite par (Olal *et al.*, 2012). Dans cette étude on n'avait pas observé la coïnfection hépatite B/D à la fois chez les patients cancers et les témoins.

Le risque associé à l'infection par ces trois virus a été évalué et nos résultats montrent que ces trois virus sont tous fortement associés au développement du carcinome hépatocellulaire chez les patients Camerounais. Nos résultats montrent une multiplication par 16, 9 et 29 en cas d'une infection par le virus de l'hépatite B, C et Delta respectivement. Nos résultats montrent que les facteurs de risque viraux sont les principales causes du CHC au Cameroun car sur environ 85% des cas on a dénoté au moins un marqueur viral. Les patients cancers infectés par le VHB sont très jeunes comparé à ceux infecté par le VHC qui sont tous âgés de plus de 50 ans. Ceci montre donc que la cinétique de progression vers le CHC pourrait être plus lente comparé à celle du VHB.

Cette étude est la première qui évalue l'impact du virus de l'hépatite E chez les patients présentant une hépatite virale B et C et même un carcinome hépatocellulaire. Depuis quelques années, les cas d'hépatite E chronique ont été identifiés chez les patients immunodréprimés infectés par le virus de l'immunodéficience humaine, les patients transplantés, les patients cancéreux subissant des chimiothérapies, et les patients présentant une première hépatite B et/ou C (Hamid *et al.*, 2002; Hoan *et al.*, 2015; Ramachandran *et al.*, 2004).

Les données sur le passage de l'hépatite virale E en phase chronique sont très parcelaires. Le rôle additif de l'hépatite E comme facteur de risque associé au développement du carcinome hépatocellulaire demeure presque méconnue. Dans la présente étude, nos résultats montrent une très forte prévalence des marqueurs sérologiques d'infection par le VHE chez les patients infectés par les virus des hépatites B et C comparés aux patients sans hépatite. Nos résultats sont en accord avec les données disponibles dans la littérature (Atiq *et al.*, 2009b; Hoan *et al.*, 2015; Kc *et al.*, 2006). Les taux d'enzymes hépatiques ont été significativement élevés chez les patients cancers positifs en hépatite E comparé aux patients sans hépatite E. Nos résultats s'apparentent à ceux de Hoan et collaborateurs en 2015 qui avaient évalué l'impact du VHE chez les patients Vietnamiens infectés par le VHB.

L'impact de la réplication virale, divers génotypes et certaines mutations du virus de l'hépatite B et C ont également été reportés dans diverses régions du globe (Chu, Hussain et

Lok, 2002b; M.-H. Lee *et al.*, 2010; T. Liang *et al.*, 2013; Mendy *et al.*, 2010). Dans la présente étude, l'augmentation de la charge virale est un facteur qui accentue la progression vers le CHC. Cette augmentation est d'autant plus critique chez les patients présentant des charges virales au delà de 100 000UI/ml. Nos résultats suggèrent donc qu'une réduction du taux de réplication virale pourrait être un bon moyen de suivi limitant ainsi la progression vers la chronicité et le cancer. Globalement, 10 génotypes du VHB et 7 génotypes du VHC sont décrits. Dans la présente étude, seuls les génotypes A et E ont été identifiés chez les patients Camerounais présentant un CHC qui découle de l'infection par le VHB. Nos résultats ont montré une forte prédominance significative du quasi sous génotype A3 (QS-A3). Le QS-A3 est l'appellation donnée aux anciens génotypes A3, A4 et A5 précédemment décrits. Nos résultats sur la prédominance du génotype A chez les cas sont en accord à ceux de l'étude réalisée en Afrique du Sud où l'on avait dénoté une très forte prédominance du génotype A1 chez les patients cancers (Kramvis, 2014; Kramvis et Kew, 2007). Cependant, nos résultats sont en désaccord à ceux détectés en Afrique de l'Ouest où le génotype E avait été majoritairement détecté chez les patients présentant un carcinome hépatocellulaire (Gouas *et al.*, 2012).

Pour ce qui est de l'impact des génotypes du VHC sur le développement du CHC, nos résultats ont montré une très forte prédominance du génotype 4 chez les patients cancers comparé aux témoins hépatite C sans cancer. Cependant, le sous génotype 4f était prédominant. Nos résultats sur la prédominance du génotype 4 chez divers patients infectés par le VHC sont en accord avec diverses études réalisées en Afrique Centrale et au Cameroun (Njouom *et al.*, 2009, 2012). Pour ce qui est de la prédominance du génotype 4f, nos résultats diffèrent des données disponibles sur les patients sans CHC en Afrique noire et au Cameroun où les études réalisées en République Centrafricaine et au Gabon ont révélé une prédominance des génotypes 4k et 4e respectivement (Njouom *et al.*, 2009, 2012).

Diverses mutations du VHB et VHC sont connues comme facteurs accentuant la survenue du CHC dans diverses régions du globe. Dans la présente étude, les mutations ont été analysées au niveau des gènes Pré-S et C du virus de l'hépatite B et des gènes NS5B et capsid du virus de l'hépatite C. Pour ce qui est des mutations nucléotidiques au niveau des fragments Pré-core/core du virus de l'hépatite B, les mutations C1766T, T1768A, G1862A et G1862T ont été significativement identifiées chez les cas, comparé aux témoins hépatite B sans cancer. Nos résultats suggèrent que ces mutations pourraient être utilisées comme marqueurs prédictifs de progression vers le carcinome hépatocellulaire. Nos résultats sont

accord avec diverses données reportées dans la littérature chez les patients asiatiques (Z. Y. Gao *et al.*, 2007; T. Liang *et al.*, 2013; S. Liu *et al.*, 2009). De même, les codons 87, 159 et 211 du fragment precore /core ont fortement été mutés chez les cas et les témoins, ce qui suggère une fois de plus que ces mutations peuvent être utilisées comme des marqueurs prédictifs de progression vers le CHC, le fait de les identifier à la fois chez les cas nous amène à penser que ces mutations surgissent très tôt lors de l'infection par le VHB. Nos résultats sont similaires à ceux de (Kim, Lee, Hwang, Kook et Kim, 2012).

Dans la même lancée, nos données sur la forte prévalence de la mutation A1762T, G1764A, ainsi que la double mutation A1762T/G1764A sur le développement du CHC sont en accord avec les données publiées dans la littérature, ces mutations ont été tous fortement détectées à la fois chez les cas et les témoins sans aucune différence statistiquement significative. Ce qui suggère que ces mutations seraient des marqueurs prédictifs d'évolution vers la chronicité et les affections associées à cette chronicité tel que le CHC (S. Liu *et al.*, 2009; Y. Yang, Sun, Zhao, Bray et Xiang, 2015). Nos résultats démontrent que les mutations A1762T, G1764A apparaîtraient très tôt avant la mise en place de la tumeur.

Pour ce qui est des mutations du virus de l'hépatite B au niveau du gène Pre-S, nos résultats ont révélé la présence des mutations C2875A, G2951C et C3116T uniquement chez les cas. Ce qui amène donc à penser que ces mutations pourraient être également des marqueurs prédictifs de la progression vers le CHC et que ces mutations ne surgissent pas tôt car absentes chez les témoins sans cancer dans la présente étude. Nos résultats s'apparentent à ceux de (Xie *et al.*, 2010) et suggèrent que ces mutations sont également des marqueurs prédictifs pour le développement du carcinome hépatocellulaire chez les patients Camerounais.

Pour ce qui est des mutations du gène capsid, nos résultats ont montré une forte prédominance des mutations aux positions 10, 70, et 91 chez les cas, comparé aux témoins; nos résultats sont en accord à ceux reportés dans d'autres études (Z. Hu *et al.*, 2009; Jaspe *et al.*, 2012; Seko *et al.*, 2013). Les études antérieures ont démontré que la présence de ces substitutions était responsable des échecs thérapeutiques et par conséquent engendrait la progression vers le CHC. Nos résultats suggèrent donc que ces mutations pourraient également être des marqueurs prédictifs des échecs thérapeutiques chez les patients à risque. En ce qui concerne les mutations au niveau du gène NS5B, on n'a pas noté de différence statistiquement significative sur les différentes mutations dénotées chez les cas et les témoins.

Cela pourrait se justifier par le fait que les mutations sont associées aux échecs thérapeutiques et par conséquent à la progression vers le CHC. Dans la présente étude, les altérations génétiques associées au développement du CHC ont été déterminées par identification des facteurs de susceptibilité (Haplogroupes mitochondriaux) au CHC puis par identification des altérations génétiques circulantes pouvant servir pour le diagnostic précoce (Taux d'ADN mitochondriaux, mutations R249S, polymorphisme R72P).

Nos résultats ont révélé des taux d'ADN mitochondriaux significativement faibles chez les cas, comparé aux témoins et suggèrent donc une déplétion des mitochondries au cours du développement du CHC. Nos résultats sont identiques à ceux trouvés dans diverses études (Chatterjee, Mambo et Sidransky, 2006; Hsu, Lee et Wei, 2013; Shao *et al.*, 2004). Notre observation suggère que la quantification du taux d'ADN mitochondrial pourrait être utilisée comme outil de diagnostic précoce du développement d'un CHC.

Pour ce qui est de la détermination des différents haplogroupes mitochondriaux circulant chez les patients Camerounais, nos résultats ont montré une distribution identique des sous différents types de l'haplogroupe L chez les cas et les témoins. Nos résultats montrent, par conséquent, que l'haplogroupe mitochondrial ne constitue pas un marqueur de susceptibilité pour le développement du CHC au Cameroun. Notre étude est toutefois la première en Afrique Sub-saharienne. D'autres études doivent être menées pour confirmer ce résultat préliminaire. Cependant, nos résultats sont en désaccord avec des données disponibles chez les patients Asiatiques où l'haplogroupe M et ses sous types représentent un marqueur de susceptibilité pour le développement du CHC (GUO *et al.*, 2012; R. Zhang *et al.*, 2010).

Dans plus de 50% des cancers humains, le gène TP53 est généralement trouvé muter. Dans la présente étude, ce gène a été analysé dans l'optique d'investiguer le rôle du polymorphisme du codon 72 ainsi que de la mutation affectant le codon 249 (R249S) du gène TP53 sur le développement du CHC. Pour ce qui est du polymorphisme R72P les proportions en variants proline (P) et arginine (R) ont été identiquement détectées chez les cas et les témoins. Nos résultats indiquent que ce polymorphisme pourrait ne pas être un facteur associé au développement du CHC chez les patients Camerounais. Nos résultats sont cependant différents de ceux rapportés par (Ezzikouri *et al.*, 2007) sur les patients Marocains où les résultats avaient présenté des fortes prévalences des variants proline homozygotes chez les cas par comparaison aux témoins. Les résultats de la détection de la mutation R249S du gène p53 ont montré un taux de mutations significativement plus élevé chez les cas par comparaison aux témoins sans affections hépatiques. Nos résultats sont identiques à ceux reportés en

Gambie (Gouas *et al.*, 2012) et en Thaïlande (Stephanie Villar *et al.*, 2012). Nos résultats montrent que la détection de la mutation R249S pourrait être utilisée comme un marqueur pronostic du CHC chez les patients à risque.

CONCLUSIONS

Au terme de ce travail dont l'objectif était d'identifier dans un premier temps les différents types de cancers primitifs du foie diagnostiqués au Cameroun puis les facteurs de risque viraux et les altérations génétiques qui sont associés à leur développement, il ressort donc que:

1- Les deux types de CPF diagnostiqués au Cameroun de Jan 2004 à Jan 2013 sont:

- ❖ CHC (98,8%) avec les sous variants morphologiques: trabéculaire, acinaire, fibreux et à cellules claires.
- ❖ HB (1,2%).

2-1) Les agents virologiques impliqués dans le développement des CPF au Cameroun sont:

- ❖ Les hépatites virales B, C,D et E avec les risques associé à l'infection par chacun de ces virus de 16, 10, 29 et 6 respectivement.

2-2) Les paramètres virologiques qui accentuent le risque de développer un CPF sont:

- ❖ Une charge virale élevée (dès 100 000 UI/mL),
- ❖ L'infection par le QS-A3 du VHB et 4f du VHC,
- ❖ La présence des mutations T87I/P159A_VHB et K10R/T72E/G77A_VHC

3- L'identification des marqueurs génétiques circulants associés aux CPF:

- ❖ La répartition génotypiques du polymorphisme mono nucléotidiques sur le codon 72 et les haplogroupes mitochondriaux ne constituent pas des marqueurs de susceptibilité génétiques des CPF au Cameroun;
- ❖ Les mutations ponctuelles sur le génome mitochondrial et sur le codon 249 du gène TP53 sont les altérations génétiques des CPF au Cameroun.

PERSPECTIVES

En perspective, on envisage réaliser des travaux supplémentaires qui permettront de:

1. Rechercher le rôle des facteurs non virologiques notamment celui des mycotoxines sur le développement des CPF car la mutation R249S témoigne une contamination des aliments par les mycotoxines.
2. Identifier d'autres mutations virales par amplifications des génomes complets; car ici seules les de références connus ont été amplifiés.
3. Rechercher d'autres marqueurs génétiques circulants des CPF autres que ceux identifier dans la présente étude

CONTRIBUTION DE CE TRAVAIL

Ce travail fourni une épidémiologie plus détaillée des cancers primitifs du foie au Cameroun.

Epidémiologie et Santé Publique

- ❖ Fourni aux autorités de santé une épidémiologie plus détaillée des CPF,
- ❖ Encourage les autorités médicales à mettre en place des politiques de prévention et de prise en charge thérapeutique des patients infectés.
- ❖ Recommande la mise en place d'un système de contrôle et de sécurité des aliments.

Science fondamentale et pratique médicale

- ❖ De nouveaux marqueurs diagnostics des CPF ont été définis,
- ❖ Les rôles respectifs des principaux facteurs viraux des CPF ont été clarifiés.

REFERENCES

- Abbas, Z., Abbas, M., Abbas, S. et Shazi, L. (2015). Hepatitis D and hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 7(5), 777-786. doi:10.4254/wjh.v7.i5.777
- Abbas, Z. et Afzal, R. (2013). Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. *World Journal of Hepatology*, 5(12), 666-675. doi:10.4254/wjh.v5.i12.666
- Abdel-Misih, S. R. Z. et Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. *The Surgical clinics of North America*, 90(4), 643-653. doi:10.1016/j.suc.2010.04.017
- Acharya, S. K. (2014). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in India. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 4(Suppl 3), S27-S33. doi:10.1016/j.jceh.2014.05.013
- Aggarwal, R. (2013). Diagnosis of hepatitis E. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(1), 24-33. doi:10.1038/nrgastro.2012.187
- Ahmad, I., Holla, R. P. et Jameel, S. (2011). Molecular Virology of Hepatitis E Virus. *Virus research*, 161(1), 47-58. doi:10.1016/j.virusres.2011.02.011
- Akarca, U. S. et Lok, A. S. (1995). Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 22(1), 50-60.
- Akuta, N., Suzuki, F., Hirakawa, M., Kawamura, Y., Sezaki, H., Suzuki, Y., ... Kumada, H. (2011). Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. *Journal of Medical Virology*, 83(6), 1016-1022. doi:10.1002/jmv.22094
- Akuta, N., Suzuki, F., Hirakawa, M., Kawamura, Y., Yatsuji, H., Sezaki, H., ... Kumada, H. (2009). Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b are the important predictor of severe insulin resistance in patients without cirrhosis and diabetes mellitus. *Journal of Medical Virology*, 81(6), 1032-1039. doi:10.1002/jmv.21473
- Al Naamani, K., Al Sinani, S. et Deschênes, M. (2013). Epidemiology and treatment of hepatitis C genotypes 5 and 6. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 27(1), e8-e12. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3545628/>

- Albertoni, G., Castelo Girão, M. J. B. et Schor, N. (2014). Mini review: Current molecular methods for the detection and quantification of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. *International Journal of Infectious Diseases*, 25, 145-149. doi:10.1016/j.ijid.2014.04.007
- Ali, A., Abdel-Hafiz, H., Suhail, M., Al-Mars, A., Zakaria, M. K., Fatima, K., ... Qadri, I. (2014). Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(30), 10238-10248. doi:10.3748/wjg.v20.i30.10238
- Ali-Mahamat, M. et Njouom, R. (2015). High rate of infection with hepatitis C virus genotype 4 in Chad, Central Africa. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(4), 608. doi:10.4103/0255-0857.167343
- Alvarado-Mora, M. V., Locarnini, S., Rizzetto, M. et Pinho, J. R. R. (2013). An update on HDV: virology, pathogenesis and treatment. *Antiviral Therapy*, 18(3 Pt B), 541-548. doi:10.3851/IMP2598
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., ... Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465.
- Anwar, W. A., Khaled, H. M., Amra, H. A., El-Nezami, H. et Loffredo, C. A. (2008). Changing pattern of hepatocellular carcinoma (HCC) and its risk factors in Egypt: possibilities for prevention. *Mutation Research*, 659(1-2), 176-184. doi:10.1016/j.mrrev.2008.01.005
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Visoná, K. A. et Magnius, L. O. (1997). Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(4), 851-858.
- Arauz-Ruiz, Patricia, Norder, H., Robertson, B. H. et Magnius, L. O. (2002). Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 8), 2059-2073. doi:10.1099/0022-1317-83-8-2059
- Aravalli, R. N., Steer, C. J. et Cressman, E. N. K. (2008). Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(6), 2047-2063. doi:10.1002/hep.22580

- Arbuthnot, P. et Kew, M. (2001). Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *International Journal of Experimental Pathology*, 82(2), 77-100. doi:10.1111/j.1365-2613.2001.iep0082-0077-x
- Arzumanyan, A., Reis, H. M. G. P. V. et Feitelson, M. A. (2013). Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Cancer*, 13(2), 123-135. doi:10.1038/nrc3449
- Ashfaq, U. A., Javed, T., Rehman, S., Nawaz, Z. et Riazuddin, S. (2011). An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology Journal*, 8, 161. doi:10.1186/1743-422X-8-161
- Asmah, R. H., Boamah, I., Afodzinu, M., Brown, C. A., Brandful, J., Adjei, D. N., ... Wiredu, E. K. (2014). Prevalence of hepatitis d infection in patients with hepatitis B virus-related liver diseases in Accra, Ghana. *West African Journal of Medicine*, 33(1), 32-36.
- Atiq, M., Shire, N. J., Barrett, A., Rouster, S. D., Sherman, K. E. et Shata, M. T. (2009a). Hepatitis E Virus Antibodies in Patients with Chronic Liver Disease. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3), 479-481. doi:10.3201/eid1503.080740
- Atiq, M., Shire, N. J., Barrett, A., Rouster, S. D., Sherman, K. E. et Shata, M. T. (2009b). Hepatitis E Virus Antibodies in Patients with Chronic Liver Disease. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3), 479-481. doi:10.3201/eid1503.080740
- Attwa, M. H. et El-Etreby, S. A. (2015a). Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 7(12), 1632-1651. doi:10.4254/wjh.v7.i12.1632
- Attwa, M. H. et El-Etreby, S. A. (2015b). Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 7(12), 1632-1651. doi:10.4254/wjh.v7.i12.1632
- Bahri, O., Ezzikouri, S., Alaya-Bouafif, N. B., Iguer, F., Feydi, A. E. E., Mestiri, H., ... Benjelloun, S. (2011). First multicenter study for risk factors for hepatocellular carcinoma development in North Africa. *World Journal of Hepatology*, 3(1), 24-30. doi:10.4254/wjh.v3.i1.24
- Banerjee, A., Ray, R. B. et Ray, R. (2010). Oncogenic Potential of Hepatitis C Virus Proteins. *Viruses*, 2(9), 2108-2133. doi:10.3390/v2092108

- Bartenschlager, R. et Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 7), 1631-1648. doi:10.1099/0022-1317-81-7-1631
- Bartenschlager, Ralf, Cosset, F.-L. et Lohmann, V. (2010). Hepatitis C virus replication cycle. *Journal of Hepatology*, 53(3), 583-585. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.015
- Bartenschlager, Ralf, Lohmann, V. et Penin, F. (2013). The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 482-496. doi:10.1038/nrmicro3046
- Batinac, T., Gruber, F., Lipozencić, J., Zamolo-Koncar, G., Stasić, A. et Brajac, I. (2003). Protein p53-structure, function, and possible therapeutic implications. *Acta Dermatovenerologica Croatica: ADC*, 11(4), 225-230.
- Beck, J. et Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(1), 48-64. doi:10.3748/wjg.v13.i1.48
- Bell, T. G. et Kramvis, A. (2013). Mutation Reporter Tool: An online tool to interrogate loci of interest, with its utility demonstrated using hepatitis B virus. *Virology Journal*, 10, 62. doi:10.1186/1743-422X-10-62
- Bergamaschi, D., Samuels, Y., Sullivan, A., Zvelebil, M., Breysens, H., Bisso, A., ... Lu, X. (2006). iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nature Genetics*, 38(10), 1133-1141. doi:10.1038/ng1879
- Bhatia, S. N., Underhill, G. H., Zaret, K. S. et Fox, I. J. (2014). Cell and Tissue Engineering for Liver Disease. *Science translational medicine*, 6(245), 245sr2. doi:10.1126/scitranslmed.3005975
- Bhatnagar, P. K., Papas, E., Blum, H. E., Milich, D. R., Nitecki, D., Karels, M. J. et Vyas, G. N. (1982). Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(14), 4400-4404.
- Bialecki, E. S. et Di Bisceglie, A. M. (2005). Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB : The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 7(1), 26-34. doi:10.1080/13651820410024049

- Bismuth, B., Castel, H., Boleslawski, E., Buob, D., Lambert, M., Declerck, N., ... Dharancy, S. (2009). Primary sarcoma of the liver and transplantation: a case study and literature review. *Rare Tumors*, 1(2), e31. doi:10.4081/rt.2009.e31
- Blumberg, B. S. (2002). The discovery of the hepatitis B virus and the invention of the vaccine: a scientific memoir. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17 Suppl, S502-503.
- Bonino, F., Heermann, K. H., Rizzetto, M. et Gerlich, W. H. (1986). Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *Journal of Virology*, 58(3), 945-950.
- Bosch, F. X., Ribes, J., Cléries, R. et Díaz, M. (2005). Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clinics in Liver Disease*, 9(2), 191-211, v. doi:10.1016/j.cld.2004.12.009
- Bosch, F. X., Ribes, J., Díaz, M. et Cléries, R. (2004). Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1), S5-S16.
- Bradley, D. W., Maynard, J. E., Popper, H., Cook, E. H., Ebert, J. W., McCaustland, K. A., ... Fields, H. A. (1983). Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *The Journal of Infectious Diseases*, 148(2), 254-265.
- Bradley, D. W., McCaustland, K. A., Cook, E. H., Schable, C. A., Ebert, J. W. et Maynard, J. E. (1985). Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology*, 88(3), 773-779.
- Brichler, S., Gal, F. L., Neri-Pinto, F., Mansour, W., Roulot, D., Laperche, S. et Gordien, E. (2014). Serological and Molecular Diagnosis of Hepatitis Delta Virus Infection: Results of a French National Quality Control Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1694-1697. doi:10.1128/JCM.03521-13
- Bruix, J. et Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(3), 1020-1022. doi:10.1002/hep.24199
- Cainelli, F. (2008). Hepatitis C virus infection in the elderly: epidemiology, natural history and management. *Drugs & Aging*, 25(1), 9-18.

- Candido, A., Taffon, S., Chionne, P., Pisani, G., Madonna, E., Dettori, S., ... Ciccaglione, A. R. (2012). Diagnosis of HEV infection by serological and real-time PCR assays: a study on acute non-A-C hepatitis collected from 2004 to 2010 in Italy. *BMC Research Notes*, 5, 297. doi:10.1186/1756-0500-5-297
- Carman, W. F., Zanetti, A. R., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., ... Thomas, H. C. (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet (London, England)*, 336(8711), 325-329.
- Caron, M., Bouscaillou, J. et Kazanji, M. (2012). Acute risk for hepatitis E virus infection among HIV-1-positive pregnant women in central Africa. *Virology Journal*, 9, 254. doi:10.1186/1743-422X-9-254
- Castellanos-Rizaldos, E., Paweletz, C., Song, C., Oxnard, G. R., Mamon, H., Jänne, P. A. et Makrigiorgos, G. M. (2015). Enhanced Ratio of Signals Enables Digital Mutation Scanning for Rare Allele Detection. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 17(3), 284-292. doi:10.1016/j.jmoldx.2014.12.003
- Cenac, A., Pedroso, M. L., Djibo, A., Develoux, M., Pichoud, C., Lamothe, F., ... Warter, A. (1995). Hepatitis B, C, and D virus infections in patients with chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma: a comparative study in Niger. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(4), 293-296.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. et MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews. Cancer*, 2(8), 563-572. doi:10.1038/nrc865
- Chan, H. L.-Y., Hui, A. Y., Wong, M. L., Tse, A. M.-L., Hung, L. C.-T., Wong, V. W.-S. et Sung, J. J.-Y. (2004). Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*, 53(10), 1494-1498. doi:10.1136/gut.2003.033324
- Chassagne, F., Rojas Rojas, T., Bertani, S., Bourdy, G., Eav, S., Ruiz, E., ... Deharo, E. (2016). A 13-Year Retrospective Study on Primary Liver Cancer in Cambodia: A Strikingly High Hepatitis C Occurrence among Hepatocellular Carcinoma Cases. *Oncology*, 91(2), 106-116. doi:10.1159/000446398

- Chatterjee, A., Mambo, E. et Sidransky, D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 25(34), 4663-4674. doi:10.1038/sj.onc.1209604
- Chen, B.-F., Liu, C.-J., Jow, G.-M., Chen, P.-J., Kao, J.-H. et Chen, D.-S. (2006). High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology*, 130(4), 1153-1168. doi:10.1053/j.gastro.2006.01.011
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. et Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3497-3500. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168907/>
- Chevaliez, S. et Pawlotsky, J.-M. (2006). HCV Genome and Life Cycle. Dans S.-L. Tan (dir.), *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK) : Horizon Bioscience. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1630/>
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. et Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), 359-362. doi:10.1126/science.2523562
- Chu, C.-J., Hussain, M. et Lok, A. S. F. (2002a). Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(6), 1408-1415. doi:10.1053/jhep.2002.36949
- Chu, C.-J., Hussain, M. et Lok, A. S. F. (2002b). Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(6), 1408-1415. doi:10.1053/jhep.2002.36949
- Coursaget, P., Chiron, J. P., Barres, J. L., Barin, F., Cottey, P., Tortey, E., ... Diop-Mar, I. (1984). Hepatitis B virus serological markers in Africans with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *IARC Scientific Publications*, (63), 181-198.
- Crossingham, J. L., Jenkinson, J., Woolridge, N., Gallinger, S., Tait, G. A. et Moulton, C.-A. E. (2009). Interpreting three-dimensional structures from two-dimensional images: a web-based interactive 3D teaching model of surgical liver anatomy. *HPB : The Official Journal of the*

- International Hepato Pancreato Biliary Association*, 11(6), 523-528. doi:10.1111/j.1477-2574.2009.00097.x
- Dalton, H. R. et Kamar, N. (2016). Treatment of hepatitis E virus. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(6), 639-644. doi:10.1097/QCO.0000000000000316
- de Oliveria Andrade, L. J., D'Oliveira, A., Melo, R. C., De Souza, E. C., Costa Silva, C. A. et Paraná, R. (2009). Association Between Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Global Infectious Diseases*, 1(1), 33-37. doi:10.4103/0974-777X.52979
- Debing, Y., Moradpour, D., Neyts, J. et Gouttenoire, J. (2016). Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *Journal of Hepatology*, 65(1), 200-212. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.045
- Devi, L. P., Kumar, R., Handique, A. et Kumar, M. (2014). Hepatoblastoma--a rare liver tumor with review of literature. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 45 Suppl 1, 261-264. doi:10.1007/s12029-014-9659-y
- Dienstag, J. L. (1997). Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 26(3 Suppl 1), 66S-70S. doi:10.1002/hep.510260712
- Ding, S.-L., Yang, Z.-W., Wang, J., Zhang, X.-L., Chen, X.-M. et Lu, F.-M. (2015). Integrative analysis of aberrant Wnt signaling in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 21(20), 6317-6328. doi:10.3748/wjg.v21.i20.6317
- Donato, F., Tagger, A., Gelatti, U., Parrinello, G., Boffetta, P., Albertini, A., ... Nardi, G. (2002). Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *American Journal of Epidemiology*, 155(4), 323-331.
- DONG, Y. et WANG, A. (2014). Aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma tumor suppression (Review). *Oncology Letters*, 8(3), 963-968. doi:10.3892/ol.2014.2301
- Du, H., Li, T., Zhang, H.-Y., He, Z.-P., Dong, Q.-M., Duan, X.-Z. et Zhuang, H. (2007). Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/precore with clinical features of chronic HBV infection. *Liver International: Official Journal of the*

- International Association for the Study of the Liver*, 27(2), 240-246. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01400.x
- Dubaniewicz, A. et Dubaniewicz, A. (2003). [Cholangiocarcinoma--bile ducts cancer]. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 56(1-2), 57-60.
- Duvet, S, Labiau, O., Mir, A. M., Kmićik, D., Krag, S. S., Verbert, A. et Cacan, R. (1998). Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end. *Biochemical Journal*, 335(Pt 2), 389-396. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1219794/>
- Duvet, Sandrine, Foulquier, F., Mir, A.-M., Chirat, F. et Cacan, R. (2004). Discrimination between lumenal and cytosolic sites of deglycosylation in endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins by using benzyl mannose in CHO cell lines. *Glycobiology*, 14(9), 841-849. doi:10.1093/glycob/cwh103
- Ebner, S., Lang, R., Mueller, E. E., Eder, W., Oeller, M., Moser, A., ... Kofler, B. (2011). Mitochondrial Haplogroups, Control Region Polymorphisms and Malignant Melanoma: A Study in Middle European Caucasians. *PLOS ONE*, 6(12), e27192. doi:10.1371/journal.pone.0027192
- Echejoh, G. O., Tanko, M. N., Manasseh, A. N., Ogala-Echejoh, S., Ugoya, S. O. et Mandong, B. M. (2008). Hepatocellular carcinoma in Jos, Nigeria. *Nigerian Journal of Medicine: Journal of the National Association of Resident Doctors of Nigeria*, 17(2), 210-213.
- Echeverría, N., Moratorio, G., Cristina, J. et Moreno, P. (2015). Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World Journal of Hepatology*, 7(6), 831-845. doi:10.4254/wjh.v7.i6.831
- Elkady, A., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Hirashima, N., Sugiyama, M., Khan, A., ... Mizokami, M. (2007). Evaluation of anti-hepatitis E virus (HEV) immunoglobulin A in a serological screening for HEV infection. *Journal of Gastroenterology*, 42(11), 911-917. doi:10.1007/s00535-007-2109-x

- El-Serag, H. B. (2007). Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 37 Suppl 2, S88-94. doi:10.1111/j.1872-034X.2007.00168.x
- El-Serag, H. B. (2011a). Hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 365(12), 1118-1127. doi:10.1056/NEJMra1001683
- El-Serag, H. B. (2011b). Hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 365(12), 1118-1127. doi:10.1056/NEJMra1001683
- El-Serag, H. B. (2012a). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142(6), 1264-1273.e1. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.061
- El-Serag, H. B. (2012b). Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 142(6), 1264-1273.e1. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.061
- Escobar-Gutiérrez, A., Vazquez-Pichardo, M., Cruz-Rivera, M., Rivera-Osorio, P., Carpio-Pedroza, J. C., Ruíz-Pacheco, J. A., ... Vaughan, G. (2012). Identification of Hepatitis C Virus Transmission Using a Next-Generation Sequencing Approach. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1461-1463. doi:10.1128/JCM.00005-12
- Ezzikouri, S., El feydi, A. E., Chafik, A., Benazzouz, M., El kihal, L., Afifi, R., ... Benjelloun, S. (2007). The Pro variant of the p53 codon 72 polymorphism is associated with hepatocellular carcinoma in Moroccan population. *Hepatology Research*, 37(9), 748-754. doi:10.1111/j.1872-034X.2007.00126.x
- Fang, Z.-L., Sabin, C. A., Dong, B.-Q., Ge, L.-Y., Wei, S.-C., Chen, Q.-Y., ... Harrison, T. J. (2008). HBV A1762T, G1764A mutations are a valuable biomarker for identifying a subset of male HBsAg carriers at extremely high risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(9), 2254-2262. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.01974.x
- Farazi, P. A. et DePinho, R. A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews. Cancer*, 6(9), 674-687. doi:10.1038/nrc1934

- Farci, P., Alter, H. J., Wong, D. C., Miller, R. H., Govindarajan, S., Engle, R., ... Purcell, R. H. (1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7792-7796. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC44488/>
- Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., ... Alter, H. J. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5464), 339-344.
- Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., ... Purcell, R. H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), 15394-15399.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. et Holland, P. V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England Journal of Medicine*, 292(15), 767-770. doi:10.1056/NEJM197504102921502
- Feinstone, S. M., Mihalik, K. B., Kamimura, T., Alter, H. J., London, W. T. et Purcell, R. H. (1983). Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infection and Immunity*, 41(2), 816-821.
- Feng, D.-Y., Chen, R.-X., Peng, Y., Zheng, H. et Yan, Y.-H. (1999). Effect of HCV NS3 protein on p53 protein expression in hepatocarcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 5(1), 45-46. doi:10.3748/wjg.v5.i1.45
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-386. doi:10.1002/ijc.29210
- Firdaus, R., Saha, K., Biswas, A. et Sadhukhan, P. C. (2015). Current molecular methods for the detection of hepatitis C virus in high risk group population: A systematic review. *World Journal of Virology*, 4(1), 25-32. doi:10.5501/wjv.v4.i1.25

- Fischer, K. P., Gutfreund, K. S. et Tyrrell, D. L. (2001). Lamivudine resistance in hepatitis B: mechanisms and clinical implications. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 4(2), 118-128. doi:10.1054/drup.2001.0190
- Forner, A., Llovet, J. M. et Bruix, J. (2012). Hepatocellular carcinoma. *Lancet (London, England)*, 379(9822), 1245-1255. doi:10.1016/S0140-6736(11)61347-0
- Foupouapouognigni, Y., Noah, D. N., Sartre, M. T. et Njouom, R. (2011). High Prevalence and Predominance of Hepatitis Delta Virus Genotype 1 Infection in Cameroon[▽]. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 1162-1164. doi:10.1128/JCM.01822-10
- Fujii, H., Moriyama, K., Sakamoto, N., Kondo, T., Yasuda, K., Hiraizumi, Y., ... Nakajima, E. (1992). Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184(3), 1152-1157.
- Gao, F., Liang, H., Lu, H., Wang, J., Xia, M., Yuan, Z., ... Chen, X. (2015). Global analysis of DNA methylation in hepatocellular carcinoma by a liquid hybridization capture-based bisulfite sequencing approach. *Clinical Epigenetics*, 7, 86. doi:10.1186/s13148-015-0121-1
- Gao, J., Xie, L., Yang, W.-S., Zhang, W., Gao, S., Wang, J. et Xiang, Y.-B. (2012). Risk factors of hepatocellular carcinoma--current status and perspectives. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 13(3), 743-752.
- Gao, Z. Y., Li, T., Wang, J., Du, J. M., Li, Y. J., Li, J., ... Zhuang, H. (2007). Mutations in preS genes of genotype C hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, 42(9), 761-768. doi:10.1007/s00535-007-2085-1
- Gerlich, W. H. (2013). Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology Journal*, 10, 239. doi:10.1186/1743-422X-10-239
- Goossens, N. et Hoshida, Y. (2015). Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clinical and Molecular Hepatology*, 21(2), 105-114. doi:10.3350/cmh.2015.21.2.105
- Gouas, D. A., Villar, S., Ortiz-Cuaran, S., Legros, P., Ferro, G., Kirk, G. D., ... Hainaut, P. (2012). TP53 R249S mutation, genetic variations in HBX and risk of hepatocellular carcinoma in The Gambia. *Carcinogenesis*, 33(6), 1219-1224. doi:10.1093/carcin/bgs135

- Gray, R. R., Parker, J., Lemey, P., Salemi, M., Katzourakis, A. et Pybus, O. G. (2011). The mode and tempo of hepatitis C virus evolution within and among hosts. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 131. doi:10.1186/1471-2148-11-131
- Greaves, L. C., Reeve, A. K., Taylor, R. W. et Turnbull, D. M. (2012). Mitochondrial DNA and disease. *The Journal of Pathology*, 226(2), 274-286. doi:10.1002/path.3028
- Guarnieri, M., Kim, K.-H., Bang, G., Li, J., Zhou, Y., Tang, X., ... Tong, S. (2006). Point mutations upstream of hepatitis B virus core gene affect DNA replication at the step of core protein expression. *Journal of Virology*, 80(2), 587-595. doi:10.1128/JVI.80.2.587-595.2006
- Gudima, S., Chang, J., Moraleda, G., Azvolinsky, A. et Taylor, J. (2002). Parameters of Human Hepatitis Delta Virus Genome Replication: the Quantity, Quality, and Intracellular Distribution of Viral Proteins and RNA. *Journal of Virology*, 76(8), 3709-3719. doi:10.1128/JVI.76.8.3709-3719.2002
- GUO, Z., YANG, H., WANG, C. et LIU, S. (2012). Mitochondrial DNA haplogroup M is associated with late onset of hepatocellular carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(3), 499-502. doi:10.3892/etm.2011.434
- Gupta, E., Bajpai, M. et Choudhary, A. (2014). Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian Journal of Transfusion Science*, 8(1), 19-25. doi:10.4103/0973-6247.126683
- Hai, H., Tamori, A. et Kawada, N. (2014). Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(20), 6236-6243. doi:10.3748/wjg.v20.i20.6236
- Halac, U., Béland, K., Lapierre, P., Patey, N., Ward, P., Brassard, J., ... Alvarez, F. (2012). Chronic hepatitis E infection in children with liver transplantation. *Gut*, 61(4), 597-603. doi:10.1136/gutjnl-2011-300708
- Hamid, S. S., Atiq, M., Shehzad, F., Yasmeen, A., Nissa, T., Salam, A., ... Jafri, W. (2002). Hepatitis E virus superinfection in patients with chronic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(2), 474-478. doi:10.1053/jhep.2002.34856

- Han, Y., Niu, J., Wang, D. et Li, Y. (2016). Hepatitis C Virus Protein Interaction Network Analysis Based on Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE*, 11(4). doi:10.1371/journal.pone.0153882
- Harris, C. C. (1996). Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(20), 1442-1455.
- Hassan, M. M., Li, D., El-Deeb, A. S., Wolff, R. A., Bondy, M. L., Davila, M. et Abbruzzese, J. L. (2008). Association Between Hepatitis B Virus and Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(28), 4557-4562. doi:10.1200/JCO.2008.17.3526
- Heidrich, B., Manns, M. P. et Wedemeyer, H. (2013). Treatment options for hepatitis delta virus infection. *Current Infectious Disease Reports*, 15(1), 31-38. doi:10.1007/s11908-012-0307-z
- Hoan, N. X., Tong, H. V., Hecht, N., Sy, B. T., Marcinek, P., Meyer, C. G., ... Velavan, T. P. (2015). Hepatitis E Virus Superinfection and Clinical Progression in Hepatitis B Patients. *EBioMedicine*, 2(12), 2080-2086. doi:10.1016/j.ebiom.2015.11.020
- Hohenberger, P. (1985). [The pancreas as target organ for hepatitis B virus--immunohistological detection of HBsAg in pancreatic carcinoma and chronic pancreatitis]. *Leber, Magen, Darm*, 15(2), 58-63.
- Honda, M., Kaneko, S., Shimazaki, T., Matsushita, E., Kobayashi, K., Ping, L. H., ... Lemon, S. M. (2000). Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 31(6), 1351-1359. doi:10.1053/jhep.2000.7985
- Hosaka, T., Suzuki, F., Kobayashi, M., Hirakawa, M., Kawamura, Y., Yastuji, H., ... Kumada, H. (2010). Development of HCC in patients receiving adefovir dipivoxil for lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 40(2), 145-152. doi:10.1111/j.1872-034X.2009.00582.x
- Hoshida, Y., Fuchs, B. C., Bardeesy, N., Baumert, T. F. et Chung, R. T. (2014). Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 61(1 Suppl), S79-90. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.010

- Hou, J., Liu, Z. et Gu, F. (2005). Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *International Journal of Medical Sciences*, 2(1), 50-57. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1142225/>
- Hsieh, T.-H., Liu, C.-J., Chen, D.-S. et Chen, P.-J. (2006). Natural course and treatment of hepatitis D virus infection. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 105(11), 869-881. doi:10.1016/S0929-6646(09)60172-8
- Hsu, C.-C., Lee, H.-C. et Wei, Y.-H. (2013). Mitochondrial DNA alterations and mitochondrial dysfunction in the progression of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 19(47), 8880-8886. doi:10.3748/wjg.v19.i47.8880
- Hu, S., Zhao, L., Yang, J. et Hu, M. (2013). The association between polymorphism of P53 codon 72 Arg/Pro and hepatocellular carcinoma susceptibility: evidence from a meta-analysis of 15 studies with 3704 cases. *Meta Gene*, 1, 126-137. doi:10.1016/j.mgene.2013.09.010
- Hu, Z., Muroyama, R., Kowatari, N., Chang, J., Omata, M. et Kato, N. (2009). Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, 100(12), 2465-2468. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01338.x
- Hughes, J. M., Wilson, M. E., Teshale, E. H., Hu, D. J. et Holmberg, S. D. (2010). The Two Faces of Hepatitis E Virus. *Clinical Infectious Diseases*, 51(3), 328-334. doi:10.1086/653943
- Hughes, S. A., Wedemeyer, H. et Harrison, P. M. (2011). Hepatitis delta virus. *Lancet (London, England)*, 378(9785), 73-85. doi:10.1016/S0140-6736(10)61931-9
- Hung, W.-Y., Wu, C.-W., Yin, P.-H., Chang, C.-J., Li, A. F.-Y., Chi, C.-W., ... Lee, H.-C. (2010). Somatic mutations in mitochondrial genome and their potential roles in the progression of human gastric cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1800(3), 264-270. doi:10.1016/j.bbagen.2009.06.006
- Husa, P., Linhartová, A., Nemecek, V. et Husová, L. (2005). Hepatitis D. *Acta Virologica*, 49(4), 219-225.

- Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. W. et Harris, C. C. (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, 26(15), 2166-2176. doi:10.1038/sj.onc.1210279
- Hutchinson, S. J., Bird, S. M. et Goldberg, D. J. (2005). Influence of alcohol on the progression of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 3(11), 1150-1159.
- Hwang, G.-Y., Lin, C.-Y., Huang, L.-M., Wang, Y.-H., Wang, J.-C., Hsu, C.-T., ... Wu, C.-C. (2003). Detection of the hepatitis B virus X protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5598-5603.
- Jacobson, I. M., Dienstag, J. L., Werner, B. G., Brettler, D. B., Levine, P. H. et Mushahwar, I. K. (1985). Epidemiology and clinical impact of hepatitis D virus (delta) infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 5(2), 188-191.
- Jammeh, S., Tavner, F., Watson, R., Thomas, H. C. et Karayiannis, P. (2008). Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 4), 901-909. doi:10.1099/vir.0.83468-0
- Janovitz, T., Sadelain, M. et Falck-Pedersen, E. (2014). Adeno-associated virus type 2 preferentially integrates single genome copies with defined breakpoints. *Virology Journal*, 11, 15. doi:10.1186/1743-422X-11-15
- Jaspe, R. C., Sulbarán, Y. F., Sulbarán, M. Z., Loureiro, C. L., Rangel, H. R. et Pujol, F. H. (2012). Prevalence of amino acid mutations in hepatitis C virus core and NS5B regions among Venezuelan viral isolates and comparison with worldwide isolates. *Virology Journal*, 9, 214. doi:10.1186/1743-422X-9-214
- Jeng, W.-J., Lin, C.-C., Chen, W.-T., Sheen, I.-S., Lin, C.-Y. et Lin, S.-M. (2014). Adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma after curative treatment. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 32(6), 747-754. doi:10.1159/000368017

- Jeong, S. W., Jang, J. Y. et Chung, R. T. (2012). Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *Clinical and molecular hepatology*, 18(4), 347-356. doi:10.3350/cmh.2012.18.4.347
- Kaczynski, J., Hansson, G. et Wallerstedt, S. (1996). Incidence of primary liver cancer and aetiological aspects: a study of a defined population from a low-endemicity area. *British Journal of Cancer*, 73(1), 128-132.
- Kage, M., Kosai, K., Shimamatsu, K., Nakashima, O., Haramaki, M., Yasunaga, M., ... Govindarajan, S. (1992). Incidence of hepatitis D virus infection in Japanese patients with hepatocellular carcinoma--immunohistochemical investigation of the delta antigen. *The Kurume Medical Journal*, 39(4), 231-234.
- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.-S., Ijaz, S., Izopet, J. et Dalton, H. R. (2012). Hepatitis E. *Lancet (London, England)*, 379(9835), 2477-2488. doi:10.1016/S0140-6736(11)61849-7
- Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F. et Izopet, J. (2014). Hepatitis E Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(1), 116-138. doi:10.1128/CMR.00057-13
- Kannan, H., Fan, S., Patel, D., Bossis, I. et Zhang, Y.-J. (2009). The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *Journal of Virology*, 83(13), 6375-6382. doi:10.1128/JVI.02571-08
- Kao, J.-H. (2011). Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 26(3), 255-261. doi:10.3904/kjim.2011.26.3.255
- Karayannis, P., Saldanha, J., Monjardino, J., Farci, P. et Thomas, H. C. (1991). Prevention and treatment of hepatitis delta virus infection. *Progress in Clinical and Biological Research*, 364, 377-383.
- Kawabe, K., Worawut, R., Taura, S., Shimogiri, T., Nishida, T. et Okamoto, S. (2014). Genetic Diversity of mtDNA D-loop Polymorphisms in Laotian Native Fowl Populations. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(1), 19-23. doi:10.5713/ajas.2013.13443
- Kc, S., Mishra, A. K. et Shrestha, R. (2006). Hepatitis E virus infection in chronic liver disease causes rapid decompensation. *JNMA; Journal of the Nepal Medical Association*, 45(161), 212-215.

- Kew, M. C. (2010). Hepatocellular carcinoma in African Blacks: Recent progress in etiology and pathogenesis. *World Journal of Hepatology*, 2(2), 65-73. doi:10.4254/wjh.v2.i2.65
- Kew, M. C. (2011). Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26 Suppl 1, 144-152. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06546.x
- Kew, M. C. (2013). Epidemiology of hepatocellular carcinoma in sub-Saharan Africa. *Annals of Hepatology*, 12(2), 173-182.
- Khudyakov, Y. et Kamili, S. (2011). Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Research*, 161(1), 84-92. doi:10.1016/j.virusres.2011.06.006
- Khuroo, M. S., Rustgi, V. K., Dawson, G. J., Mushahwar, I. K., Yattoo, G. N., Kamili, S. et Khan, B. A. (1994). Spectrum of hepatitis E virus infection in India. *Journal of Medical Virology*, 43(3), 281-286.
- Khuroo, Mehnaaz S. et Khuroo, M. S. (2016). Hepatitis E: an emerging global disease - from discovery towards control and cure. *Journal of Viral Hepatitis*, 23(2), 68-79. doi:10.1111/jvh.12445
- Khuroo, Mohammad S., Khuroo, M. S. et Khuroo, N. S. (2016). Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World Journal of Gastroenterology*, 22(31), 7030-7045. doi:10.3748/wjg.v22.i31.7030
- Khuroo, Mohammad Sultan. (2011a). Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Research*, 161(1), 3-14. doi:10.1016/j.virusres.2011.02.007
- Khuroo, Mohammad Sultan. (2011b). Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Research*, 161(1), 3-14. doi:10.1016/j.virusres.2011.02.007
- Kim, D.-W., Lee, S.-A., Hwang, E.-S., Kook, Y.-H. et Kim, B.-J. (2012). Naturally Occurring Precore/Core Region Mutations of Hepatitis B Virus Genotype C Related to Hepatocellular Carcinoma. *PLOS ONE*, 7(10), e47372. doi:10.1371/journal.pone.0047372

- Koike, K. (1987). [Hepatitis B virus integration and oncogene activation]. *Gan to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy*, 14(6 Pt 2), 2152-2163.
- KONDILI, L. A., CHIONNE, P., PORCARO, A., MADONNA, E., TAFFON, S., RESULI, B., ... RAPICETTA, M. (2006). Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) antibody and the possible association with chronic liver disease: a case-control study in Albania. *Epidemiology and Infection*, 134(1), 95-101. doi:10.1017/S095026880500470X
- Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E., Purdy, M. A., Rozanov, M. N., Reyes, G. R. et Bradley, D. W. (1992). Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(17), 8259-8263.
- Koschel, M., Oed, D., Gerelsaikhan, T., Thomssen, R. et Bruss, V. (2000). Hepatitis B Virus Core Gene Mutations Which Block Nucleocapsid Envelopment. *Journal of Virology*, 74(1), 1-7. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC111506/>
- Kouyos, R. D., Rauch, A., Braun, D. L., Yang, W.-L., Böni, J., Yerly, S., ... Swiss HIV Cohort Study (SHCS). (2014). Higher risk of incident hepatitis C virus coinfection among men who have sex with men, in whom the HIV genetic bottleneck at transmission was wide. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(10), 1555-1561. doi:10.1093/infdis/jiu315
- Krain, L. J., Nelson, K. E. et Labrique, A. B. (2014). Host immune status and response to hepatitis E virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(1), 139-165. doi:10.1128/CMR.00062-13
- Kramvis, A. (2014). Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology*, 57(3-4), 141-150. doi:10.1159/000360947
- Kramvis, A. et Kew, M. C. (2007). Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 37(s1), S9-S19. doi:10.1111/j.1872-034X.2007.00098.x

- Kremsdorf, D., Soussan, P., Paterlini-Brechot, P. et Brechot, C. (2006). Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene*, 25(27), 3823-3833. doi:10.1038/sj.onc.1209559
- Kuang, S.-Y., Jackson, P. E., Wang, J.-B., Lu, P.-X., Muñoz, A., Qian, G.-S., ... Groopman, J. D. (2004). Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3575-3580. doi:10.1073/pnas.0308232100
- Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., ... Stevens, C. E. (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4902), 362-364.
- Kurihara, T., Yoshizumi, T., Itoh, S., Harimoto, N., Harada, N., Ikegami, T., ... Maehara, Y. (2016). Chronic hepatitis E virus infection after living donor liver transplantation via blood transfusion: a case report. *Surgical Case Reports*, 2. doi:10.1186/s40792-016-0159-0
- Lavie, M., Goffard, A. et Dubuisson, J. (2006). HCV Glycoproteins: Assembly of a Functional E1-E2 Heterodimer. Dans S.-L. Tan (dir.), *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK) : Horizon Bioscience. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1628/>
- Le Gal, F., Gordien, E., Affolabi, D., Hanslik, T., Alloui, C., Dény, P. et Gault, E. (2005). Quantification of Hepatitis Delta Virus RNA in Serum by Consensus Real-Time PCR Indicates Different Patterns of Virological Response to Interferon Therapy in Chronically Infected Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2363-2369. doi:10.1128/JCM.43.5.2363-2369.2005
- Lee, H.-C., Li, S.-H., Lin, J.-C., Wu, C.-C., Yeh, D.-C. et Wei, Y.-H. (2004). Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutation Research*, 547(1-2), 71-78. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.12.011
- Lee, H.-C., Yin, P.-H., Lin, J.-C., Wu, C.-C., Chen, C.-Y., Wu, C.-W., ... Wei, Y.-H. (2005). Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042, 109-122. doi:10.1196/annals.1338.011

- Lee, J.-H., Han, K.-H., Lee, J. M., Park, J. H. et Kim, H.-S. (2011). Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Mutations on Hepatocellular Carcinoma Development in Chronic HBV Infection ▽. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 18(6), 914-921.
doi:10.1128/CVI.00474-10
- Lee, M.-H., Yang, H.-I., Lu, S.-N., Jen, C.-L., Yeh, S.-H., Liu, C.-J., ... Chen, C.-J. (2010). Hepatitis C virus seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: long-term predictors from a community-based cohort study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(30), 4587-4593. doi:10.1200/JCO.2010.29.1500
- Lévy, L., Renard, C. A., Wei, Y. et Buendia, M. A. (2002). Genetic alterations and oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 963, 21-36.
- Liang, T., Chen, E.-Q. et Tang, H. (2013). Hepatitis B virus gene mutations and hepatocarcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 14(8), 4509-4513.
- Liang, T. J. (2009). Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(5 Suppl), S13-S21. doi:10.1002/hep.22881
- Liao, Y., Hu, X., Chen, J., Cai, B., Tang, J., Ying, B., ... Wang, L. (2012). Precore mutation of hepatitis B virus may contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *PloS One*, 7(6), e38394. doi:10.1371/journal.pone.0038394
- Lin, S., Hoffmann, K. et Schemmer, P. (2012). Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *Liver Cancer*, 1(3-4), 144-158. doi:10.1159/000343828
- Liu, K., Hou, W., Zumbika, E. et Ni, Q. (2005). Clinical features of chronic hepatitis B patients with YMDD mutation after lamivudine therapy. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6(12), 1182-1187. doi:10.1631/jzus.2005.B1182
- Liu, L.-J., Xie, S.-X., Chen, Y.-T., Xue, J.-L., Zhang, C.-J. et Zhu, F. (2016). Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 22(33), 7486-7499. doi:10.3748/wjg.v22.i33.7486

- Liu, M., Jiang, L. et Guan, X.-Y. (2014). The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein & Cell*, 5(9), 673-691. doi:10.1007/s13238-014-0065-9
- Liu, S., Zhang, H., Gu, C., Yin, J., He, Y., Xie, J. et Cao, G. (2009). Associations Between Hepatitis B Virus Mutations and the Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 101(15), 1066-1082. doi:10.1093/jnci/djp180
- Lu, L., Li, C. et Hagedorn, C. H. (2006). Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in Medical Virology*, 16(1), 5-36. doi:10.1002/rmv.482
- Lv, L., Wang, P., Zhou, X. et Sun, B. (2013). Association between the p53 codon 72 Arg/Pro polymorphism and hepatocellular carcinoma risk. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34(3), 1451-1459. doi:10.1007/s13277-013-0649-7
- Ma, Z., Shen, Q.-H., Chen, G.-M. et Zhang, D.-Z. (2008). Biological impact of hepatitis B virus X-hepatitis C virus core fusion gene on human hepatocytes. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 14(35), 5412-5418. doi:10.3748/wjg.14.5412
- Mahoney, F. J. (1999). Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 351-366. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88921/>
- Maily, L., Robinet, E., Meuleman, P., Baumert, T. F. et Zeisel, M. B. (2013). Hepatitis C virus infection and related liver disease: the quest for the best animal model. *Frontiers in Microbiology*, 4, 213. doi:10.3389/fmicb.2013.00212
- Makino, S., Chang, M. F., Shieh, C. K., Kamahora, T., Vannier, D. M., Govindarajan, S. et Lai, M. M. (1987). Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (delta) virus RNA. *Nature*, 329(6137), 343-346. doi:10.1038/329343a0

- Malik, A., Singhal, D. K., Albanyan, A., Husain, S. A. et Kar, P. (2012). Hepatitis B virus gene mutations in liver diseases: a report from New Delhi. *PloS One*, 7(6), e39028.
doi:10.1371/journal.pone.0039028
- Manivel, V., Panda, S. K. et Rao, K. V. (1992). Identification of a new group-specific determinant on hepatitis B surface antigen with a synthetic peptide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 149(6), 2082-2088.
- Martin, P. H. et Denis, F. (1994). [Transmission of hepatitis C virus from mother to infant]. *Pathologie-Biologie*, 42(6), 593-601.
- Mbakop, A., Yomi, J., Yankeum, J., Nkegoum, B. et Mouelle Sone, A. (1997). [Cancer localisation in men and women aged over 50 in Cameroon]. *Bulletin Du Cancer*, 84(12), 1119-1122.
- Mboto, C. I., Davies-Russell, A., Fielder, M. et Jewell, A. P. (2005). Hepatocellular Carcinoma in The Gambia and the role of Hepatitis B and Hepatitis C. *International seminars in surgical oncology : ISSO*, 2, 20. doi:10.1186/1477-7800-2-20
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. et Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO Journal*, 21(15), 3980-3988. doi:10.1093/emboj/cdf414
- Mendy, M. E., Welzel, T., Lesi, O. A., Hainaut, P., Hall, A. J., Kuniholm, M. H., ... Kirk, G. D. (2010). Hepatitis B viral load and risk for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in The Gambia, West Africa. *Journal of Viral Hepatitis*, 17(2), 115-122. doi:10.1111/j.1365-2893.2009.01168.x
- Mennen, L. I., Mbanya, J. C., Cade, J., Balkau, B., Sharma, S., Chungong, S. et Cruickshank, J. K. (2000). The habitual diet in rural and urban Cameroon. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(2), 150-154.
- Merle, P. et Trepo, C. (2009). Molecular Mechanisms Underlying Hepatocellular Carcinoma. *Viruses*, 1(3), 852-872. doi:10.3390/v1030852

- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. et Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437(7062), 1167-1172. doi:10.1038/nature04193
- Minemura, M., Shimizu, Y., Hirano, K., Nakayama, Y., Tokimitsu, Y., Tajiri, K., ... Sugiyama, T. (2005). Functional analysis of transactivation by mutants of hepatitis B virus X gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 14(2), 495-499.
- Minola, E., Baldo, V., Baldovin, T., Trivello, R. et Floreani, A. (2006). Intrafamilial transmission of hepatitis C virus infection. *European Journal of Epidemiology*, 21(4), 293-297. doi:10.1007/s10654-006-0016-8
- Mittal, S. et El-Serag, H. B. (2013). Epidemiology of HCC: Consider the Population. *Journal of clinical gastroenterology*, 47(0), S2-S6. doi:10.1097/MCG.0b013e3182872f29
- Modahl, L. E. et Lai, M. M. (2000). Hepatitis delta virus: the molecular basis of laboratory diagnosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 37(1), 45-92. doi:10.1080/10408360091174178
- Mondelli, M. U. et Silini, E. (1999). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Journal of Hepatology*, 31 Suppl 1, 65-70.
- Moradpour, D. et Penin, F. (2013). Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 369, 113-142. doi:10.1007/978-3-642-27340-7_5
- Moradpour, D., Penin, F. et Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(6), 453-463. doi:10.1038/nrmicro1645
- Moraleda, G., Dingle, K., Biswas, P., Chang, J., Zuccola, H., Hogle, J. et Taylor, J. (2000). Interactions between hepatitis delta virus proteins. *Journal of Virology*, 74(12), 5509-5515.
- Motamedifar, M., Taheri, M., Lankarani, K. B., Gholami, M., Lari, M. A., Faramarzi, H. et Sarvari, J. (2015). The Prevalence and Risk Factors of Hepatitis Delta Virus in HIV/HBV Co-Infected Patients in Shiraz, Iran, 2012. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 40(5), 448-453. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567605/>

- Muroyama, R., Kato, N., Yoshida, H., Otsuka, M., Moriyama, M., Wang, 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(6), 805-812. doi:10.1016/j.jhep.2006.07.025
- Naderi, M., Gholipour, N., Zolfaghari, M. R., Moradi Binabaj, M., Yegane Moghadam, A. et Motalleb, G. (2014). Hepatitis C Virus and Vaccine Development. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(4), 207-215. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4293608/>
- Naoumov, N. V., Schneider, R., Grötzinger, T., Jung, M. C., Miska, S., Pape, G. R. et Will, H. (1992). Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology*, 102(2), 538-543.
- Ndjitoyap Ndam, E. C., Mbakop, A., Njoya, O., Ndumbe, P., Fewou, A., Gonsu, J., ... Michel, G. (1991). Cancers primitifs du foie au Cameroun : aspects épidémiologiques, cliniques et biologiques chez 130 patients. *La Semaine des hôpitaux de Paris*, 67(4-5), 139-142. Repéré à <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4956808>
- Ni, Y.-H., Chang, M.-H., Hsu, H.-Y. et Tsuei, D.-J. (2003). Different hepatitis B virus core gene mutations in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gut*, 52(1), 122-125. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1773502/>
- Nishida, N. et Goel, A. (2011). Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Current Genomics*, 12(2), 130-137. doi:10.2174/138920211795564359
- Niu, Z., Zhang, P. et Tong, Y. (2016). Age and gender distribution of Hepatitis C virus prevalence and genotypes of individuals of physical examination in WuHan, Central China. *SpringerPlus*, 5(1). doi:10.1186/s40064-016-3224-z
- Njouom, R., Caron, M., Besson, G., Ndong-Atome, G.-R., Makuwa, M., Pouillot, R., ... Kazanji, M. (2012). Phylogeography, risk factors and genetic history of hepatitis C virus in Gabon, central Africa. *PloS One*, 7(8), e42002. doi:10.1371/journal.pone.0042002

- Njouom, R., Frost, E., Deslandes, S., Mamadou-Yaya, F., Labbé, A.-C., Pouillot, R., ... Pépin, J. (2009). Predominance of hepatitis C virus genotype 4 infection and rapid transmission between 1935 and 1965 in the Central African Republic. *The Journal of General Virology*, 90(Pt 10), 2452-2456. doi:10.1099/vir.0.011981-0
- Njouom, R., Pasquier, C., Ayouba, A., Sandres-Sauné, K., Mfoupouendoun, J., Mony Lobe, M., ... Nerrienet, E. (2003). Hepatitis C virus infection among pregnant women in Yaounde, Cameroon: prevalence, viremia, and genotypes. *Journal of Medical Virology*, 69(3), 384-390. doi:10.1002/jmv.10300
- Njoya, O., Tayou, T., Kamga, J. P., Ongolo Zogo, P., Ndjitoyap Ndam, E. C. et Gonsu, J. (2000). Traitement du carcinome hépatocellulaire par injection percutanée d'éthanol absolu au Cameroun. *Médecine d'Afrique noire*, 47(12), 532-536. Repéré à <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=840226>
- Noh, R., Lee, D. H., Kwon, B. W., Kim, Y. H., Kim, S. B. et Song, I. H. (2016). Clinical Impact of Viral Load on the Development of Hepatocellular Carcinoma and Liver-Related Mortality in Patients with Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016. doi:10.1155/2016/7476231
- Norder, H., Couroucé, A. M. et Magnius, L. O. (1992). Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *The Journal of General Virology*, 73 (Pt 12), 3141-3145. doi:10.1099/0022-1317-73-12-3141
- Olal, S. O., Akere, A., Otegbayo, J. A., Odaibo, G. N., Olaleye, D. O., Afolabi, N. B. et Bamgboye, E. A. (2012). Are patients with primary hepatocellular carcinoma infectious of hepatitis B, C and D viruses? *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, 41 Suppl, 187-191.
- Olinger, C. M., Venard, V., Njayou, M., Oyefolu, A. O. B., Maïga, I., Kemp, A. J., ... 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(Pt 5), 1163-1173. doi:10.1099/vir.0.81614-0

- Olivero, A. et Smedile, A. (2012). Hepatitis delta virus diagnosis. *Seminars in Liver Disease*, 32(3), 220-227. doi:10.1055/s-0032-1323627
- O’Riordan, J. M., Conroy, A., Nourse, C., Yap, P. L., McDonald, G. S., Kaminski, G., ... Power, J. (1998). Risk of hepatitis C infection in neonates transfused with blood from donors infected with hepatitis C. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, 8(4), 303-308.
- Ørsted, D. D., Bojesen, S. E., Tybjaerg-Hansen, A. et Nordestgaard, B. G. (2007). Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1295-1301.
doi:10.1084/jem.20062476
- Papatheodoridis, G. V. et Hadziyannis, S. J. (2001). Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *Journal of Viral Hepatitis*, 8(5), 311-321.
- Pascarella, S. et Negro, F. (2011). Hepatitis D virus: an update. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 31(1), 7-21. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02320.x
- Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., MacKay, P., ... Murray, K. (1979). Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature*, 282(5739), 575-579.
- Pasquier, C., Njouom, R., Ayouba, A., Dubois, M., Sartre, M. T., Vessière, A., ... Nerrienet, E. (2005). Distribution and heterogeneity of hepatitis C genotypes in hepatitis patients in Cameroon. *Journal of Medical Virology*, 77(3), 390-398. doi:10.1002/jmv.20468
- Patel, T. (2006). Cholangiocarcinoma. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology*, 3(1), 33-42. doi:10.1038/ncpgasthep0389
- Paul, D., Hoppe, S., Saher, G., Krijnse-Locker, J. et Bartenschlager, R. (2013). Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *Journal of Virology*, 87(19), 10612-10627. doi:10.1128/JVI.01370-13
- Pecic, V., Stankovic-Djordjevic, D., Nestorovic, M., Radojkovic, M., Marjanovic, H., Ilic, B. et Milojkovic, M. (2011). Hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 16(2), 277-281.

- Penin, F. (2003). Structural biology of hepatitis C virus. *Clinics in Liver Disease*, 7(1), 1-21, vii.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D. et Pawlotsky, J.-M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(1), 5-19. doi:10.1002/hep.20032
- Perret, J.-L., Moussavou-Kombila, J.-B., Delaporte, E., Pemba, L.-F., Boguikouma, J.-B., Matton, T. et Larouze, B. (2008a). HBs Ag and antibodies to hepatitis C virus in complicated chronic hepatic diseases in Gabon. /data/revues/03998320/AN_00260002/131/. Repéré à <http://www.em-consulte.com/en/article/159004>
- Perret, J.-L., Moussavou-Kombila, J.-B., Delaporte, E., Pemba, L.-F., Boguikouma, J.-B., Matton, T. et Larouze, B. (2008b). HBs Ag and antibodies to hepatitis C virus in complicated chronic hepatic diseases in Gabon. /data/revues/03998320/AN_00260002/131/. Repéré à <http://www.em-consulte.com/en/article/159004>
- Peters van Ton, A. M., Gevers, T. J. G. et Drenth, J. P. H. (2015). Antiviral therapy in chronic hepatitis E: a systematic review. *Journal of Viral Hepatitis*, 22(12), 965-973. doi:10.1111/jvh.12403
- Petruzzello, A., Marigliano, S., Loquercio, G. et Cacciapuoti, C. (2016). Hepatitis C virus (HCV) genotypes distribution: an epidemiological up-date in Europe. *Infectious Agents and Cancer*, 11, 53. doi:10.1186/s13027-016-0099-0
- Pineau, P., Marchio, A., Battiston, C., Cordina, E., Russo, A., Terris, B., ... Dejean, A. (2008). Chromosome instability in human hepatocellular carcinoma depends on p53 status and aflatoxin exposure. *Mutation Research*, 653(1-2), 6-13. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.01.012
- Pontisso, P., Poon, M. C., Tiollais, P. et Brechot, C. (1984). Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 288(6430), 1563-1566. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1441279/>
- Pourkarim, M. R., Amini-Bavil-Olyaei, S., Kurbanov, F., Van Ranst, M. et Tacke, F. (2014). Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), 7152-7168. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7152

- Puig-Basagoiti, F., Cabana, M., Guilera, M., Giménez-Barcons, M., Sirera, G., Tural, C., ... Martínez, M. A. (2000). Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 23(1), 89-94.
- Purdy, M. A. (2007). Hepatitis B virus S gene escape mutants. *Asian Journal of Transfusion Science*, 1(2), 62-70. doi:10.4103/0973-6247.33445
- Ramachandran, J., Eapen, C. E., Kang, G., Abraham, P., Hubert, D. D. J., Kurian, G., ... Chandy, G. M. (2004). Hepatitis E superinfection produces severe decompensation in patients with chronic liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(2), 134-138.
- Ranjith-Kumar, C. T. et Kao, C. C. (2006). Biochemical Activities of the HCV NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase. Dans S.-L. Tan (dir.), *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK) : Horizon Bioscience. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1629/>
- Ray, R. B., Lagging, L. M., Meyer, K. et Ray, R. (1996). Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *Journal of Virology*, 70(7), 4438-4443. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC190377/>
- Rein, D. B., Stevens, G. A., Theaker, J., Wittenborn, J. S. et Wiersma, S. T. (2012). The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(4), 988-997. doi:10.1002/hep.25505
- Reyes, G. R., Huang, C. C., Tam, A. W. et Purdy, M. A. (1993). Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Archives of Virology. Supplementum*, 7, 15-25.
- Riveiro-Barciela, M., Buti, M., Homs, M., Campos-Varela, I., Cantarell, C., Crespo, M., ... Rodriguez-Frías, F. (2014). Cirrhosis, liver transplantation and HIV infection are risk factors associated with hepatitis E virus infection. *PloS One*, 9(7), e103028. doi:10.1371/journal.pone.0103028

- Rizzetto, M., Canese, M. G., Aricò, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F. et 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(12), 997-1003.
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Purcell, R. H., London, W. T., Sly, L. D. et Gerin, J. L. (1981). Experimental HBV and delta infections of chimpanzees: occurrence and significance of intrahepatic immune complexes of HBcAg and delta antigen. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1(6), 567-574.
- Rizzetto, Mario. (2009). Hepatitis D: thirty years after. *Journal of Hepatology*, 50(5), 1043-1050. doi:10.1016/j.jhep.2009.01.004
- Rockey, D. C., Caldwell, S. H., Goodman, Z. D., Nelson, R. C., Smith, A. D. et American Association for the Study of Liver Diseases. (2009). Liver biopsy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(3), 1017-1044. doi:10.1002/hep.22742
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., ... Bartenschlager, R. (2012). Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathogens*, 8(12). doi:10.1371/journal.ppat.1003056
- Rooney, G. et Gilson, R. J. (1998). Sexual transmission of hepatitis C virus infection. *Sexually Transmitted Infections*, 74(6), 399-404.
- Sadeghian, H., Varasteh, N., Esmaelzadeh, A., Nomani, H., Alimardani, M., Davoodnejad, M., ... Meshkat, Z. (2015). Distribution of Hepatitis Delta Virus Genotypes in Mashhad, Northeast Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2). doi:10.5812/jjm.14908
- Salazar-Vizcaya, L., Kouyos, R. D., Zahnd, C., Wandeler, G., Battegay, M., Darling, K. E. A., ... Swiss HIV Cohort Study. (2016). Hepatitis C virus transmission among human immunodeficiency virus-infected men who have sex with men: Modeling the effect of behavioral and treatment interventions. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 64(6), 1856-1869. doi:10.1002/hep.28769

- Sarma, M. P., Asim, M., Medhi, S., Bharathi, T., Diwan, R. et Kar, P. (2012). Viral Genotypes and Associated Risk Factors of Hepatocellular Carcinoma in India. *Cancer Biology & Medicine*, 9(3), 172-181. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2012.03.004
- Schaefer, S. (2007). Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology*, 13(1), 14-21.
- Schon, E. A., DiMauro, S. et Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature reviews. Genetics*, 13(12), 878-890. doi:10.1038/nrg3275
- Seko, Y., Akuta, N., Suzuki, F., Kawamura, Y., Sezaki, H., Suzuki, Y., ... Kumada, H. (2013). Amino acid substitutions in the hepatitis C Virus core region and lipid metabolism are associated with hepatocarcinogenesis in nonresponders to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology*, 56(1), 13-21. doi:10.1159/000339993
- Selimovic, D., El-Khattouti, A., Ghozlan, H., Haikel, Y., Abdelkader, O. et Hassan, M. (2012). Hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: An insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies. *World Journal of Hepatology*, 4(12), 342-355. doi:10.4254/wjh.v4.i12.342
- Sethi, N. et Kang, Y. (2011). Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nature Reviews. Cancer*, 11(10), 735-748. doi:10.1038/nrc3125
- Shakil, A. O., Hadziyannis, S., Hoofnagle, J. H., Di Bisceglie, A. M., Gerin, J. L. et Casey, J. L. (1997). Geographic Distribution and Genetic Variability of Hepatitis Delta Virus Genotype I. *Virology*, 234(1), 160-167. doi:10.1006/viro.1997.8644
- Shao, J.-Y., Gao, H.-Y., Li, Y.-H., Zhang, Y., Lu, Y.-Y. et Zeng, Y.-X. (2004). Quantitative detection of common deletion of mitochondrial DNA in hepatocellular carcinoma and hepatocellular nodular hyperplasia. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 10(11), 1560-1564. doi:10.3748/wjg.v10.i11.1560
- Shindoh, J., Hashimoto, M. et Watanabe, G. (2015). Surgical approach for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 7(1), 70-77. doi:10.4254/wjh.v7.i1.70

- Shrivastava, P. S., Shrivastava, S. R. B. L., Ramasamy, J. et Zaidi, S. H. N. (2014). Hepatitis E: Risk and Prevention. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(Suppl 3), S231-S232. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4635416/>
- Siegel, C. A., Silas, A. M., Suriawinata, A. A. et van Leeuwen, D. J. (2005). Liver biopsy 2005: when and how? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 72(3), 199-201, 206, 208 passim.
- Silva, J. L., Rangel, L. P., Costa, D. C. F., Cordeiro, Y. et De Moura Gallo, C. V. (2013). Expanding the prion concept to cancer biology: dominant-negative effect of aggregates of mutant p53 tumour suppressor. *Bioscience Reports*, 33(4). doi:10.1042/BSR20130065
- Simmonds, P. (1995). Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*, 21(2), 570-583. doi:10.1002/hep.1840210243
- Singal, A. G., Pillai, A. et Tiro, J. (2014). Early Detection, Curative Treatment, and Survival Rates for Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis: A Meta-analysis. *PLoS Medicine*, 11(4). doi:10.1371/journal.pmed.1001624
- Sklan, E. H. et Glenn, J. S. (2006). HCV NS4B: From Obscurity to Central Stage. Dans S.-L. Tan (dir.), *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK) : Horizon Bioscience. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1633/>
- Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T. et Simmonds, P. (2014). Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59(1), 318-327. doi:10.1002/hep.26744
- Solves, P., Mirabet, V. et Alvarez, M. (2014). Hepatitis B transmission by cell and tissue allografts: How safe is safe enough? *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(23), 7434-7441. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7434
- Sreeja, L., Syamala, V., Raveendran, P. B., Santhi, S., Madhavan, J. et Ankathil, R. (2008). p53 Arg72Pro polymorphism predicts survival outcome in lung cancer patients in Indian population. *Cancer Investigation*, 26(1), 41-46. doi:10.1080/07357900701638459

- Sridhar, S., Teng, J. L. L., Chiu, T.-H., Lau, S. K. P. et Woo, P. C. Y. (2017a). Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). doi:10.3390/ijms18040869
- Sridhar, S., Teng, J. L. L., Chiu, T.-H., Lau, S. K. P. et Woo, P. C. Y. (2017b). Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). doi:10.3390/ijms18040869
- Stewart, J. B. et Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 16(9), 530-542. doi:10.1038/nrg3966
- Stoll-Keller, F., Barth, H., Fafi-Kremer, S., Zeisel, M. B. et Baumert, T. F. (2009). Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress. *Expert Review of Vaccines*, 8(3), 333-345. doi:10.1586/14760584.8.3.333
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R. F. et Rossau, R. (2000). A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 1), 67-74. doi:10.1099/0022-1317-81-1-67
- Sunbul, M. (2014). Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(18), 5427-5434. doi:10.3748/wjg.v20.i18.5427
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. et Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tang, J.-C., Feng, Y.-L., Guo, T., Xie, A.-Y. et Cai, X.-J. (2016). Circulating tumor DNA in hepatocellular carcinoma: trends and challenges. *Cell & Bioscience*, 6. doi:10.1186/s13578-016-0100-z
- Tannapfel, A., Dienes, H.-P. et Lohse, A. W. (2012). The Indications for Liver Biopsy. *Deutsches Ärzteblatt International*, 109(27-28), 477-483. doi:10.3238/arztebl.2012.0477

- Tarocchi, M., Polvani, S., Marroncini, G. et Galli, A. (2014). Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(33), 11630-11640. doi:10.3748/wjg.v20.i33.11630
- Tatsukawa, M., Takaki, A., Shiraha, H., Koike, K., Iwasaki, Y., Kobashi, H., ... Yamamoto, K. (2011). Hepatitis B virus core promoter mutations G1613A and C1653T are significantly associated with hepatocellular carcinoma in genotype C HBV-infected patients. *BMC Cancer*, 11, 458. doi:10.1186/1471-2407-11-458
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(10), 836-847. doi:10.1038/nrm1489
- Taylor, J. M. (2006). Hepatitis delta virus. *Virology*, 344(1), 71-76. doi:10.1016/j.virol.2005.09.033
- Teshale, E. H. et Hu, D. J. (2011). Hepatitis E: Epidemiology and prevention. *World Journal of Hepatology*, 3(12), 285-291. doi:10.4254/wjh.v3.i12.285
- Tibbs, C. J. (1995). Methods of transmission of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 2(3), 113-119.
- Tillmann, H. L. (2014). Hepatitis C virus core antigen testing: Role in diagnosis, disease monitoring and treatment. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(22), 6701-6706. doi:10.3748/wjg.v20.i22.6701
- Torres-Puente, M., Cuevas, J. M., Jiménez-Hernández, N., Bracho, M. A., García-Robles, I., Wrobel, B., ... González-Candelas, F. (2008). Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(3), 188-199. doi:10.1111/j.1365-2893.2007.00929.x
- Udali, S., Guarini, P., Ruzzenente, A., Ferrarini, A., Guglielmi, A., Lotto, V., ... Friso, S. (2015). DNA methylation and gene expression profiles show novel regulatory pathways in hepatocellular carcinoma. *Clinical Epigenetics*, 7(1). doi:10.1186/s13148-015-0077-1
- Umoh, N. J., Lesi, O. A., Mendy, M., Bah, E., Akano, A., Whittle, H., ... Kirk, G. D. (2011). Aetiological differences in demographical, clinical and pathological characteristics of hepatocellular carcinoma in The Gambia. *Liver International: Official Journal of the*

- International Association for the Study of the Liver*, 31(2), 215-221. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02418.x
- van der Eijk, A. A., Pas, S. D. et de Man, R. A. (2017). Hepatitis E virus: A potential threat for patients with liver disease and liver transplantation. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 31(2), 143-150. doi:10.1016/j.bpg.2017.03.006
- Villar, Stéphanie, Le Roux-Goglin, E., Gouas, D. A., Plymoth, A., Ferro, G., Boniol, M., ... Hainaut, P. (2011). Seasonal variation in TP53 R249S-mutated serum DNA with aflatoxin exposure and hepatitis B virus infection. *Environmental Health Perspectives*, 119(11), 1635-1640. doi:10.1289/ehp.1103539
- Villar, Stephanie, Ortiz-Cuaran, S., Abedi-Ardekani, B., Gouas, D., Nogueira da Costa, A., Plymoth, A., ... Hainaut, P. (2012). Aflatoxin-Induced TP53 R249S Mutation in HepatoCellular Carcinoma in Thailand: Association with Tumors Developing in the Absence of Liver Cirrhosis. *PLoS ONE*, 7(6). doi:10.1371/journal.pone.0037707
- Villet, S., Pichoud, C., Billioud, G., Barraud, L., Durantel, S., Trépo, C. et Zoulim, F. (2008). Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *Journal of Hepatology*, 48(5), 747-755. doi:10.1016/j.jhep.2008.01.027
- Waghray, A., Murali, A. R. et Menon, K. N. (2015). Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *World Journal of Hepatology*, 7(8), 1020-1029. doi:10.4254/wjh.v7.i8.1020
- Waisberg, J. et Saba, G. T. (2015). Wnt-/- β -catenin pathway signaling in human hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 7(26), 2631-2635. doi:10.4254/wjh.v7.i26.2631
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 12(10), 685-698. doi:10.1038/nrc3365
- Wang, C., Zhang, F., Fan, H., Peng, L., Zhang, R., Liu, S. et Guo, Z. (2011). Sequence polymorphisms of mitochondrial D-loop and hepatocellular carcinoma outcome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(3), 493-496. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.088
- Weiner, A. J., Brauer, M. J., Rosenblatt, J., Richman, K. H., Tung, J., Crawford, K., ... Houghton, M. (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to

- the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology*, 180(2), 842-848.
- Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., ... Crawford, K. A. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), 3468-3472.
- White, E. F., Garfein, R. S., Brouwer, K. C., Lozada, R., Ramos, R., Firestone-Cruz, M., ... Strathdee, S. A. (2007). Prevalence of hepatitis C virus and HIV infection among injection drug users in two Mexican cities bordering the U.S. *Salud publica de Mexico*, 49(3), 165-172. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2743977/>
- Wong, R. J., Ahmed, A. et Gish, R. G. (2015). Elevated alpha-fetoprotein: differential diagnosis - hepatocellular carcinoma and other disorders. *Clinics in Liver Disease*, 19(2), 309-323. doi:10.1016/j.cld.2015.01.005
- Wu, J. C. (2006). Functional and clinical significance of hepatitis D virus genotype II infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 307, 173-186.
- Xie, J.-X., Zhao, J., Yin, J.-H., Zhang, Q., Pu, R., Lu, W.-Y., ... Cao, G.-W. (2010). Association of novel mutations and haplotypes in the preS region of hepatitis B virus with hepatocellular carcinoma. *Frontiers of Medicine in China*, 4(4), 419-429. doi:10.1007/s11684-010-0160-0
- Yamamoto, K., Horikita, M., Tsuda, F., Itoh, K., Akahane, Y., Yotsumoto, S., ... Mayumi, M. (1994). Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *Journal of Virology*, 68(4), 2671-2676. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC236744/>
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., ... Li, W. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *ELife*, 1, e00049. doi:10.7554/eLife.00049
- Yang, H.-I., Yeh, S.-H., Chen, P.-J., Iloeje, U. H., Jen, C.-L., Su, J., ... Chen, C.-J. (2008). Associations Between Hepatitis B Virus Genotype and Mutants and the Risk of Hepatocellular

- Carcinoma. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 100(16), 1134-1143.
doi:10.1093/jnci/djn243
- Yang, Y., Sun, J.-W., Zhao, L.-G., Bray, F. et Xiang, Y.-B. (2015). Quantitative evaluation of hepatitis B virus mutations and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis of prospective studies. *Chinese Journal of Cancer Research*, 27(5), 497-508. doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2015.10.05
- Yau, A. H. L. et Yoshida, E. M. (2014). Hepatitis C drugs: the end of the pegylated interferon era and the emergence of all-oral interferon-free antiviral regimens: a concise review. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 28(8), 445-451.
- Yuen, M.-F., Tanaka, Y., Shinkai, N., Poon, R. T., But, D. Y.-K., Fong, D. Y.-T., ... Lai, C.-L. (2008). Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/C, specific mutations of enhancer II/core promoter/precore regions and HBV DNA levels. *Gut*, 57(1), 98-102. doi:10.1136/gut.2007.119859
- Zein, N. N. (2000). Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 223-235. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC100152/>
- Zhang, H.-Q., Li, S.-B., Wang, G.-H., Chen, K., Song, X.-G. et Feng, X.-Y. (2007). Detection of hepatitis C virus core antigen for early diagnosis of hepatitis C virus infection in plasma donor in China. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(19), 2738-2742.
doi:10.3748/wjg.v13.i19.2738
- Zhang, R., Zhang, F., Wang, C., Wang, S., Shiao, Y.-H. et Guo, Z. (2010). Identification of sequence polymorphism in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for hepatocellular carcinoma with distinct etiology. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 29(1), 130. doi:10.1186/1756-9966-29-130
- Zhou, J.-Y., Zhang, L., Li, L., Gu, G.-Y., Zhou, Y.-H. et Chen, J.-H. (2012). High hepatitis B virus load is associated with hepatocellular carcinomas development in Chinese chronic hepatitis B patients: a case control study. *Virology Journal*, 9, 16. doi:10.1186/1743-422X-9-16

Ziaee, M. et Azarkar, G. (2013). Prevalence of Hepatitis D Virus Infection Among Patients With Chronic Hepatitis B Attending Birjand Hepatitis Clinic (East of Iran) in 2012. *Hepatitis Monthly*, 13(8). doi:10.5812/hepatmon.11168

ANNEXES

ANNEXE 1: Exemple de questionnaire standardisé

INFORMATIONS CONFIDENTIELLES

Nom du patient : _____

Prénom : _____

Nom d'un parent (si enfant) : _____

Activité professionnelle : _____

Adresse : _____

Age : _____ Mois Années

Sexe : M F

FACTEURS DE RISQUE D'INFECTION HEPATIQUE

Transfusion sanguine : Non oui ne sait pas

Si oui : En quelle année ?

De l'acupuncture ou de la mésothérapie Non oui ne sait pas

Des dialyses Non oui ne sait pas

Des scarifications, tatouages, piercings non oui ne sait pas

Une Infection sexuellement transmise non oui ne sait pas

Des soins dentaires fréquents non oui ne sait pas

Des soins dentaires occasionnels non oui ne sait pas

Une fibroscopie ou tout autre examen invasif non oui ne sait pas

ANTECEDENTS ET COMORBIDITES

Consommation d'alcool : non occasionnel régulier

Si régulier : durée de consommation en année : _____ dose journalière (en g/24h) : _____

Diabète non oui ne sait pas

Hépatite familiale non oui ne sait pas

Cancers familiaux non oui ne sait pas

Si oui précisez _____

Maladie génétique non oui ne sait pas

Si oui précisez _____

DONNEES BIOLOGIQUES

AFP :

Ag HBs : positif négatif

Ac HCV : positif négatif

Ac HBc : positif négatif

TP :

NFS : GB GR Hb Plaq

DONNEES CLINIQUES

Symptômes

Fièvre : oui non

Douleur abdominale : oui non

Asthénie : oui non

Signes

Ascite : oui non

OMI : oui non

Ictère : oui non

HPM : oui non

SPM : oui non

Hémorragie digestive : oui non

ANNEXE 2: Considération éthique
**COMITÉ NATIONAL D'ETHIQUE
NATIONAL ETHICS COMMITTEE**


- N° d'enregistrement : IORG0006538-IRB00007847-FWA00016054 BP 1937 Yaoundé. Tel/Fax: (237) 22 21 12 84
- Arrêté N° 079/A/MSP/DS du 22 octobre 1987 portant création et organisation d'un Comité d'Ethique sur la Recherche impliquant les êtres humains
cnecprot@yahoo.fr

Yaoundé, le 02 août 2011

AUTORISATION N°199/CNE/SE/2011
CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Ethique a examiné ce 1^{er} août 2011, le projet de recherche intitulé: **"CARACTERISATION DES NOUVEAUX BIOMARQUEURS SERIQUES DU CANCER PRIMITIF DU FOIE CHEZ LES PATIENTS CAMEROUNAIS"** soumis par **le Dr NJOUOM Richard**, Centre Pasteur du Cameroun.

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et médical. Sa mise en œuvre permettrait d'identifier des nouveaux marqueurs circulants associés à une augmentation du risque de développer un cancer primitif du foie chez les patients atteints de maladie hépatique au Cameroun. La procédure de recherche présume un projet scientifiquement valide. Elle expose les participants aux risques physiques liés aux prélèvements sanguins et aux divers gestes médicaux. Toutefois, ces gestes médicaux seront faits par un personnel médical qualifié, sous procédures stériles. Par ailleurs, les procédures d'obtention du consentement éclairé et de protection de la confidentialité des données respectent les normes éthiques. La notice d'information et le formulaire de consentement éclairé des participants contiennent toutes les informations nécessaires. Les CVs des investigateurs les décrivent capables de mettre en œuvre l'étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Ethique approuve pour une période d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

Le Dr NJOUOM Richard est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé au Cameroun et ne devra y apporter aucun amendement aussi mineur qu'il soit sans avis favorable du Comité National d'Ethique. Il devra informer au premier cas et le plus tôt possible le Comité National d'Ethique, l'autorité sanitaire du Cameroun, et le promoteur du présent projet, de la survenue de tout incident inattendu lors de la mise en œuvre du protocole. Il devra admettre toute descente du Comité National d'Ethique pour suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé. Les rapports annuel et final du projet devront être soumis au Comité National d'Ethique et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La mise en œuvre du projet peut être suspendue en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations sus-mentionnées.

En foi de quoi la présente Clairance Ethique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

LE PRESIDENT

LE PRESIDENT
Lazare KAPTUE

ANNEXE 3 : Autorisation administrative

| | | |
|--|---|--|
| REPUBLIQUE DU CAMEROUN Paix – Travail - Patrie ----- MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE ----- SECRETARIAT D'ETAT A LA SANTE ----- SECRETARIAT GENERAL ----- DIVISION DE LA RECHERCHE OPERATIONNELLE EN SANTE |  | REPUBLIC OF CAMEROON Peace – Work - Fatherland ----- MINISTRY OF PUBLIC HEALTH ----- SECRETARIAT OF STATE FOR PUBLIC HEALTH ----- SECRETARIAT GENERAL ----- DIVISION OF HEALTH OPERATIONS RESEARCH |
| N° <u>D30-104</u> AAR/MINSANTE/SESP/SG/DRS/CRC/CEA1 | | Yaoundé, le <u>11 FEV 2012</u> |

Le MINISTRE

Au
Dr. Richard NJOUOM, PhD
Centre Pasteur du Cameroun
A Yaoundé
Tel. (237)99654767.

Objet : Autorisation Administrative de Recherche

N° 631-01.12

Après examen du projet de recherche intitulé “ **Caractérisation des nouveaux Biomarqueurs Sériques du Cancer Primitif du Foie chez les patients Camerounais** ”, introduit par le DGI du CPC en votre nom en qualité d’investigateur principal ,et aux noms de Dr Patrice Yves T. TCHENDJOU , Dr Paul Jean Adrien ATANGANA du CPC, Dr Dominique NOAH NOAH et Dr Pierre ONGOLO ZOGO tous ces deux derniers de l’Hôpital Central de Yaoundé(HCY) comme co-investigateurs.

J’ai l’honneur de vous signifier l’Autorisation Administrative à démarrer cette recherche. En tant qu’investigateur principal, vous devez assurer la conduite de cette recherche comme stipulée dans le présent protocole. Vous voudrez bien noter que la Division de la Recherche Opérationnelle en Santé est chargée du suivi de la conformité aux principes de bioéthique de ce projet et devra être tenue informée de vos activités, ainsi que des conclusions de cette recherche. Le Ministère de la Santé publique se réserve par ailleurs le droit d’arrêter celui-ci en cas de non respect du protocole approuvé et auquel cette Autorisation est donnée.

Toute nouvelle découverte au cours de cette recherche devra être signalée à l’Administration avant publication et les deux parties, le Réseau International des Instituts Pasteur (IIP) et l’Administration détiendront les droits de propriété intellectuelle.

Toute modification du présent protocole devra être signalée à l’Administration après une nouvelle approbation par le comité d’éthique. Le numéro de votre autorisation Administrative sus référencée en dessous de l’objet, devra être cité dans vos courriers ultérieurs.

Copies :

- MINRESI
- CAB/MSP/SESP
- SG/MINSANTE
- DROS
- Archives / chrono

Site web : www.minsante.cm / www.minsante.gov.cm Tel : (237) 23 23 45 48 / Fax : (237) 23 23 45 70

ANNEXE 4 : Préparation des solutions

➤ Préparation des différentes solutions de lavage

Toutes les différentes solutions utilisées lors de l'analyse des différents marqueurs sérologiques ont été diluées 20 fois (20x). Suivant chaque cycle de lavage, et le volume de solution utilisée par puits, on ramenait cette solution de lavage à 1x suivant cette formule: $fd=Vf/Vi$. Avec Vf= volume final et Vi=volume initial et fd=Facteur de dilution.

➤ Dilution des Amorces

Les solutions stocks de toutes les différentes amorces utilisées avaient pour concentration initiale 100µM. Au cours des différents tests, on procédait à une dilution au 10^e de façon à obtenir plutôt une concentration de 10µM dans chaque tube.

ANNEXE 5 : Articles