



**HAL**  
open science

# PRÉVALENCE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES SOUCHES HBV ET HDV CIRCULANT AU NIGER ET EN MAURITANIE

Wael Mansour

► **To cite this version:**

Wael Mansour. PRÉVALENCE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES SOUCHES HBV ET HDV CIRCULANT AU NIGER ET EN MAURITANIE. Microbiologie et Parasitologie. Université d'Angers, 2012. Français. NNT: . tel-00991555

**HAL Id: tel-00991555**

**<https://theses.hal.science/tel-00991555>**

Submitted on 15 May 2014

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

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

**PRÉVALENCE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES SOUCHES HBV ET HDV  
CIRCULANT AU NIGER ET EN MAURITANIE**

THÈSE DE DOCTORAT

**Spécialité** : Biologie (Microbiologie)

**ÉCOLE DOCTORALE** : BIOLOGIE SANTE

**Présentée et soutenue publiquement** :

**le** : 03/07/2012

** ** : Angers

**par** : Wael MANSOUR

**Devant le jury ci-dessous** :

<b>Président du jury</b>	Eric PICHARD (PUPH, Université d'Angers)
<b>Rapporteur</b>	Camille SUREAU (PhD, CNRS, INTS Paris)
<b>Rapporteur</b>	Alain GOUDEAU (PUPH, Université de Tours)
<b>Examineur</b>	Syria LAPERCHE (MD, PhD, INTS Paris)
<b>Directeur de thèse</b>	Françoise LUNEL-FABIANI (PUPH, Université d'Angers)
<b>Co-directeur de thèse</b>	Emmanuel GORDIEN (MCUPH, Université Paris 13)
<b>Nom et coordonnées du Laboratoire</b>	Laboratoire HIFIH UPRES 3859, IFR 132, Faculté de Médecine, Université d'Angers

**ED (N )** .....

*Je dédie ce travail,*

*À mes chers parents, pour leur amour et leur encouragement depuis toujours*

*À ma petite famille : Sylvie, Alex et Elie pour leur soutien permanent*

## **REMERCIEMENTS :**

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le **Professeur Françoise LUNEL-FABIANI** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche et pour m'avoir permis de poursuivre ce travail. A ses côtés, j'ai énormément appris, notamment la rigueur et l'autonomie. Merci d'avoir consacré du temps à la réalisation de ce travail. Soyez assurée de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie également le **Docteur Emmanuel GORDIEN**, mon co-directeur de thèse. J'ai particulièrement apprécié nos discussions autant scientifiques qu'humaines, et un grand merci pour sa disponibilité, sa collaboration permanente et ses conseils enrichissants.

Je tiens à remercier le **Professeur Eric PICHARD** pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie le **Professeur Alain GOUDEAU** et le **Docteur Camille SUREAU** pour avoir accepté de consacrer de leur temps à la lecture de ce mémoire. Et enfin, je remercie le **Docteur Syria LAPERCHE** d'avoir accepté d'être examinateur.

Je souhaite remercier également le **Professeur Paul CALES** pour m'avoir permis de disposer des résultats de ses calculs de fibromètres réalisés chez les patients Mauritaniens, le **Docteur Frédéric LE GAL**, le **Docteur Chakib ALLOUI**, le **Docteur Ségolène BRICHLER**, le **Docteur Alexandra DUCANCELLE** et le **Docteur Pascal VIELLON** pour ses conseils et les discussions que nous avons partagées dans le cadre de ce travail.

J'exprime aussi ma reconnaissance à **Céline CAMBON** et **Khalissa BOUARGUE** pour leur aide et pour leur disponibilité.

Merci à toute l'équipe du **Laboratoire de Virologie du CHU d'Angers** et du **CHU d'Avicenne** pour leurs conseils et toute l'aide apportée.

Enfin je remercie tous **les médecins et scientifiques mauritaniens** qui ont collaboré à ce travail.

# SOMMAIRE

<b>RESUME .....</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>6</b>
<b>1 INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Le virus de l'hépatite B.....</b>	<b>10</b>
1.1.1 Introduction .....	10
1.1.2 Épidémiologie.....	11
1.1.3 Organisation génétique de l'HBV .....	14
1.1.4 Cycle viral de l'HBV .....	18
1.1.5 Particules virales.....	25
1.1.6 Bases moléculaires de la variabilité génétique .....	28
1.1.7 Génotypes et sous génotypes HBV.....	31
1.1.8 Impact de la variabilité génétique de HBV sur l'histoire naturelle de l'hépatite virale .....	43
<b>1.2 Le virus de l'hépatite D.....</b>	<b>53</b>
1.2.1 Introduction .....	53
1.2.2 Épidémiologie.....	56
1.2.3 Génome, antigénome et ARN messagers de l'HDV.....	60
1.2.4 Cycle viral .....	61
1.2.5 Les protéines virales .....	64
1.2.6 Bases moléculaires de la variabilité génétique : .....	65
1.2.7 Génotypes HDV .....	68
1.2.8 Impact de la co-infection B-Delta sur la sévérité de la maladie hépatique .....	73
<b>1.3 Prise en charge des patients infectés par l'HBV et/ou l'HDV .....</b>	<b>78</b>
1.3.1 Prise en charge des patients infectés par l'HBV .....	78
1.3.2 Prise en charge des patients infectés par l'HDV.....	82
<b>1.4 Infection HBV / HDV dans la région du Sahara en Afrique .....</b>	<b>87</b>
1.4.1 Épidémiologie.....	87
1.4.2 Données moléculaires.....	90
<b>1.5 Buts du travail : Etude de l'épidémiologie moléculaire de l'HBV et de l'HDV en mauritanie et dans la région du sahara.....</b>	<b>93</b>
1.5.1 Eléments d'histoire de la Mauritanie et de la région du Sahara Africain .....	93
1.5.2 Infection HBV/HDV dans la région du Sahara en Afrique .....	96
1.5.3 Buts du travail.....	96
<b>2 RESULTATS .....</b>	<b>98</b>
<b>2.1 Résultats 1 : caractérisation moléculaire des souches HBV circulant au Niger.....</b>	<b>99</b>
<b>2.2 Résultats-2 : épidémiologie moléculaire des souches HBV et HDV en Mauritanie .....</b>	<b>112</b>
2.2.1 Première partie de l'étude (femmes enceintes et consultants au Centre Hospitalier de Nouakchott (CHN) et au centre d'Arafat).....	112
2.2.2 Deuxième partie : Epidémiologie moléculaire B et Delta chez les donneurs de sang .....	145
<b>2.3 Résultats 3 : caractérisation moléculaire des souches HBV et HDV circulant en mauritanie.....</b>	<b>164</b>

2.3.1	Introduction :	164
2.3.2	Matériels et méthodes	166
2.3.3	Résultats et discussion :	168
<b>3</b>	<b>DISCUSSION GENERALE- CONCLUSION - PERSPECTIVES</b>	<b>182</b>
<b>4</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>191</b>
<b>5</b>	<b>ARTICLES ET POSTERS</b>	<b>211</b>

## RESUME

Le portage chronique du virus de l'hépatite B (HBV) en Afrique est très élevé, avoisinant parfois jusqu'à 30% dans certaines régions. Selon l'OMS, sur les 400 millions de personnes souffrant d'une infection chronique HBV, 70 à 140 millions vivent en Afrique avec un taux de décès annuel d'environ 250 000 cas par an. Les données concernant l'infection concomitante par le virus de l'hépatite D (HDV) virus satellite de l'HBV, sont rares car peu d'études ont été réalisées en Afrique. Malgré ce fort taux de prévalence, les données concernant la caractérisation moléculaire des souches HBV et HDV sont limitées ou inexistantes dans la plupart des pays d'Afrique Subsaharienne et en particulier dans région du Sahara, vaste zone multiethnique, de passage et de brassage de populations.

Au cours de cette étude, nous avons voulu déterminer la prévalence et l'épidémiologie moléculaire des souches HBV et HDV circulant la région du Sahara (Niger et Mauritanie). Tout d'abord, nous avons étudié une cohorte de donneurs de sang du Niger porteurs de l'AgHBs. Nous avons trouvé que 80% des souches étudiées appartenaient au génotype E. De plus, nous avons identifié et caractérisé un nouveau recombinant HBV/D-HBV/E représentant près de 20% des souches étudiées. Les points de cassure se situaient dans des « points chauds » de recombinaison, régions impliquées dans les événements d'intégration du génome de l'HBV. Des analyses phylogénétiques extensives nous ont permis de le classer comme un nouveau sous génotype. Nous avons proposé HBV/D8.

Nous avons par la suite, en collaboration avec des équipes locales, étudié la diversité génétique HBV en Mauritanie, pays voisin du Niger, au sein de différents groupes représentatifs de la population : femmes enceintes (n=1020), consultants (n=954), donneurs de sang (n=11110) et patients suivis pour une infection HBV chronique (n=300). Le taux de portage de l'AgHBs, était de 11 à 18 % selon les populations étudiées, classant la Mauritanie comme pays à haute endémie pour l'HBV. L'exposition à l'HBV était associée en analyse multivariée, au niveau d'éducation, à l'ethnie, à des antécédents de transfusion et à la profession chez les femmes enceintes et, chez les consultants, au sexe masculin.

Sur le plan moléculaire, 3 génotypes différents circulaient en Mauritanie (n=240) : l'HBV/D (56,3%), l'HBV/E (34,6%) et l'HBV/A (8,8%). De façon intéressante, 30% des génotypes D circulant en Mauritanie étaient l'HBV/D8. Cette diversité de l'HBV peut être expliquée par la localisation géographique du Niger et de la Mauritanie comme zones de passage entre l'Afrique du Nord et l'Afrique Sub Saharienne où l'HDV/D et l'HBV/E respectivement sont prédominants.

D'autre part, 14 à 33% des patients HBV positifs étaient également infectés par l'HDV. La présence d'anticorps anti-Delta était associée en analyse multivariée chez les consultants, à l'âge et au sexe masculin, et chez les donneurs de sang, à l'âge, au nombre de mariages, à la profession (militaire), à la résidence (région du désert) et à des antécédents d'hospitalisation. Sur le plan moléculaire, le génotype HDV-1 est largement majoritaire (90%) mais l'HDV-5 a aussi été isolé (10% des cas).

En conclusion, ce travail souligne encore la forte prévalence des hépatites B et Delta au Niger et en Mauritanie. Nous avons aussi mis en évidence une diversité génétique importante des souches circulant et notamment la caractérisation d'un nouveau sous-génotype HBV/D8 hautement prévalent. Il convient d'évaluer la sévérité de la maladie hépatique liée à cette diversité génétique et à ce nouveau variant, notamment son implication éventuelle dans l'oncogenèse hépatique par des événements de recombinaison génétique.

**Mots clés :** HBV, HDV, prévalence, génotypes, recombinaison, Niger, Mauritanie, Afrique Sub-Saharienne.

## SUMMARY

Chronic carriage of hepatitis B virus (HBV) in Africa is very high, reaching as much as 30% in some areas. According to WHO, about 400 million people suffering from chronic HBV infection, 70 to 140,000,000 live in Africa with an annual death rate of about 250 000 cases per year. Data on concomitant infection by the hepatitis D virus (HDV), satellite of HBV, are rare because few studies have been conducted in Africa. Despite this high prevalence, data on the molecular characterization of HBV and HDV strains are limited or nonexistent in most countries of Sub-Saharan Africa and particularly in the Saharan region, a vast multi-ethnic area, crossing and mixing of populations.

In this study, we wanted to determine the prevalence and molecular epidemiology of HBV and HDV strains circulating in the Saharan region (Niger and Mauritania). First, we studied a cohort of HBsAg positive blood donors in Niger. We found that 80% of the strains tested belonged to genotype E. In addition, we identified and characterized a novel recombinant HBV/D-HBV/E, which represents nearly 20% of the strains studied. The breakpoints were located in "hot spots" of recombination regions involved in the events of integration of HBV genome. Extensive phylogenetic analyzes have allowed us to classify it as a new subgenotype. We proposed HBV/D8.

We then, in collaboration with local teams, studied the genetic HBV diversity in Mauritania, a neighboring country of Niger, in various representative groups of the population: pregnant women (n = 1020), consulting patients (n = 954) blood donors (n = 11,110) and patients treated for chronic HBV infection (n = 300). The carrier rate of HBsAg was 11 to 18% depending on the population studied, classifying Mauritania as high HBV endemic country. Exposure to HBV was associated in multivariate analysis to the level of education, ethnicity, history of transfusion and the profession in pregnant women, and in consulting patients, to male gender.

At the molecular level, three different genotypes circulate in Mauritania (n = 240): HBV/D (56.3%), HBV/E (34.6%) and HBV/A (8.8 %). Over 30% of HBV/D genotypes circulating in Mauritania were HBV/D8 (isolated and characterized in Niger). This molecular diversity of HBV can be explained by the geographical location of Niger and Mauritania in the border area as gateway between North Africa and Sub Saharan Africa where the HDV/D and HBV/E predominate respectively.

On the other hand, 14-33% of patients infected with HBV were also infected with HDV. The presence of anti-delta antibodies was associated in multivariate analysis in consulting patients, with age and male gender, and among blood donors, with age, number of marriages, occupation (military), residence (desert region) and history of hospitalization. At the molecular level, most strains belonged to genotype HDV-1 (90% of cases) but the HDV-5 was also isolated (10% of cases).

In conclusion, this study further emphasizes the high prevalence of hepatitis B and Delta Niger and Mauritania, which is a major public health problem. We also demonstrated a high genetic diversity of circulating strains, including the characterization of a new sub-genotype HBV/D8 highly prevalent. It should then assess the severity of liver disease associated with this genetic diversity and specially with this new variant, for its possible involvement in oncogenesis hepatic events of genetic recombination..

Keywords: HBV, HDV, prevalence, genotypes, recombination, Niger, Mauritania, Sub-Saharan Africa.



# 1 INTRODUCTION GENERALE

Les hépatites sont des lésions inflammatoires du foie dont les causes peuvent être multiples, alcoolique, médicamenteuse, auto-immune ou infectieuse. Quelle qu'en soit l'origine, des signes cliniques, biologiques et histologiques communs peuvent s'observer au cours des hépatites, tels l'ictère, l'augmentation de la concentration des transaminases dans le sang et la fibrose hépatique.

Les hépatites virales constituent une atteinte inflammatoire du foie liée, par définition à cinq virus désignés de A à E, virus appartenant à des familles différentes mais caractérisés par un tropisme hépatique dominant. D'autres virus comme le cytomégalovirus (CMV), le virus Epstein Barr (EBV), le virus Herpes simplex (HSV), ou les virus de la Dengue, par exemple, sont capables de provoquer des atteintes hépatiques, mais ils ne sont pas classés comme virus des hépatites. De même il a été décrit un virus de « l'hépatite G », sur le plan taxonomique apparenté au virus de l'hépatite C, cependant son implication dans les pathologies hépatiques n'a pas été établie.

Les virus des hépatites sont peu cytopathogènes. C'est surtout la réaction immunitaire liée aux lymphocytes T cytotoxiques, dirigée contre les cellules hépatiques infectées qui est responsable des lésions hépatiques. Bien que présentant des pouvoirs pathogènes proches, ces virus appartiennent à des familles différentes et s'individualisent par leur mode de transmission et leurs modalités évolutives. Tous ces virus sont constitués de génome à ARN simple brin à l'exception du virus de l'hépatite B qui est, lui, formé d'un génome à ADN partiellement double brin.

Le virus de l'hépatite A (HAV, famille des *Picornaviridae*, genre hépatovirus) et le virus de l'hépatite E (HEV, famille *Caliciviridae*, genre Hepevirus), à transmission oro-fécale sont des virus nus, non enveloppés, responsables quasi uniquement d'affections aiguës. Les virus des hépatites B (HBV, famille des *Hepadnaviridae*, genre hepadnavirus), C (HCV, famille

des *Flaviviridae*, genre hépacivirus) et le virus de l'hépatite delta ou HDV (appartenant à la famille des virus satellites), sont des virus enveloppés (l'enveloppe du virus delta étant dérivée de celle de l'HBV) qui peuvent évoluer sur un mode chronique et entraîner des complications telles la cirrhose et le cancer primitif du foie.

Les hépatites virales constituent un problème de santé publique mondiale majeur. D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS) plus de 2 milliards de personnes ont été infectées par le virus de l'hépatite B (HBV) dans le monde dont plus de 400 millions l'ont de façon chronique. L'HDV pourrait infecter environ 10 à 15 millions de personnes parmi les sujets infectés par l'HBV.

Plusieurs traitements, avec plus ou moins d'effets indésirables, existent et pour le moment, les seuls vaccins assurant une protection sont ceux dirigés contre les virus des hépatites A et B.

## 1.1 Le virus de l'hépatite B

### 1.1.1 Introduction

Le virus de l'hépatite B a été découvert en 1965 par Blumberg et associés et caractérisé par Prince ([Blumberg et al., 1965](#)).

Le virus humain, l'HBV, est le prototype d'une famille de virus appelée *Hepadnaviridae*. Au sein de cette famille, on distingue deux grandes sous-classes de virus ([Kidd-Ljunggren et al., 2002](#); [Schaefer, 2007](#)):

- les *Orthohepadnavirus*, retrouvés chez les mammifères, regroupent l'HBV et les virus infectant les primates : singe laineux (woolly monkey hepatitis B virus ou WMHBV) ([Lanford et al., 1998](#)), chimpanzé ([MacDonald et al., 2000](#); [Vaudin et al., 1988](#)), gibbon([Norder et al., 1996](#)), orang-outan ([Warren et al., 1999](#)), gorille ([Grethe et al., 2000](#)). On y retrouve également le virus de l'hépatite de la marmotte (Woodchuck hepatitis virus ou WHV) ([Summers et al., 1978](#)) et le virus de l'hépatite de l'écureuil (ground squirrel hepatitis virus ou GSHV) ([Marion et al., 1980](#)). Ces 2 derniers virus, qui ont environ 70% d'homologie avec l'HBV, sont incapables d'infecter les humains ou les primates. Inversement, l'HBV est capable d'infecter les grands singes.
- les *AVIHepadnavirus* sont des virus plus éloignés, qui présentent une organisation génomique proche, mais une faible homologie de séquence. Ils infectent les espèces aviaires, comme le canard (duck hepatitis B virus ou DHBV) ([Mason et al., 1980](#)), l'oie (snow goose hepatitis B virus ou DGHBV ; ross goose hepatitis virus ou RGHV) ([Chang et al., 1999](#)) ou le héron (heron hepatitis B virus ou HHBV) ([Sprengel et al., 1988](#)).

Parmi les 400 millions des porteurs chroniques de l'hépatite B, 78 % vivent en Asie, 16% en Afrique, 3 % en Amérique du Sud et les 3 % restants se répartissent entre l'Europe, l'Amérique du Nord et l'Océanie. L'infection par l'HBV est la principale cause d'hépatite chronique, de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire. Il est à noter que plus d'un million de décès par an dans le monde dont 250 000 en Afrique([Andernach et al., 2009a](#)) sont liés à une complication de l'infection par un virus des hépatites. L'HBV présente une grande variabilité génétique. On distingue au moins 8 génotypes désignés par des lettres, de A à H, dont certains sont subdivisés en sous génotypes.

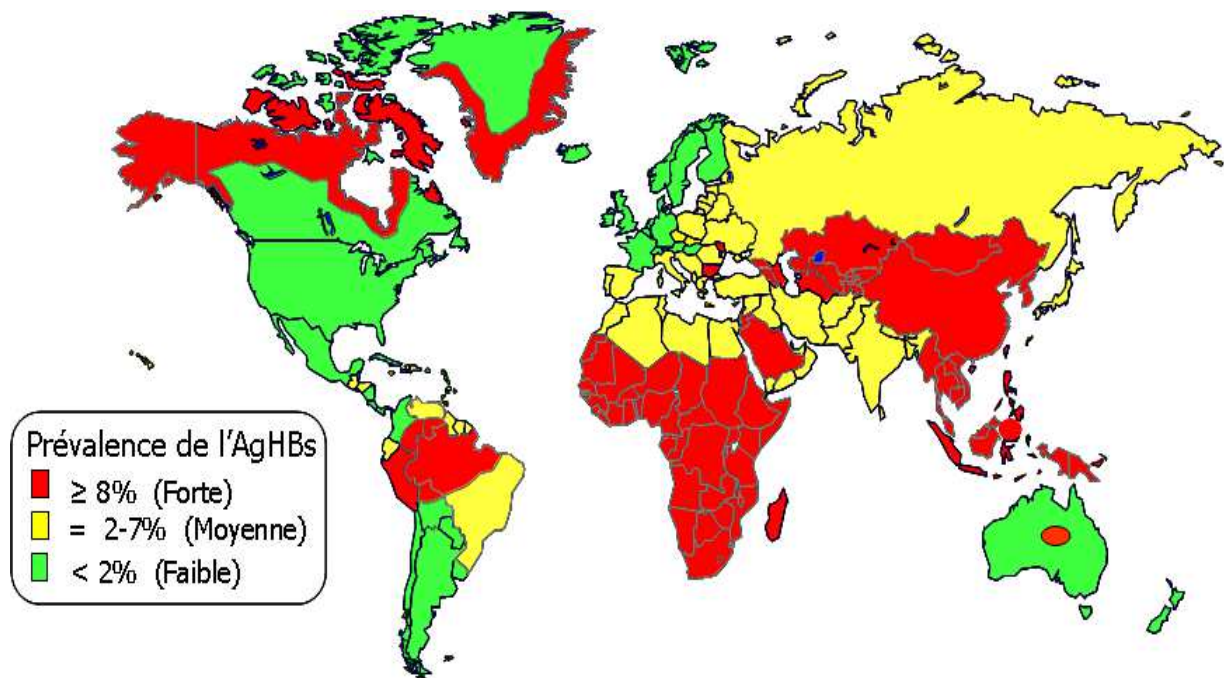
### **1.1.2 Épidémiologie**

Selon les chiffres de l'OMS, plus d'un tiers de la population mondiale a été en contact avec l'HBV, et plus de 400 millions de sujets sont des porteurs chroniques de l'HBV. La définition du portage chronique correspond à la persistance, chez un patient, de l'antigène (Ag) HBs pendant plus de 6 mois.

Le virus de l'hépatite B est ubiquitaire, mais la prévalence de l'infection varie selon les différentes régions du globe. Ainsi, considérant le portage de l'AgHBs, on distingue des zones de faible endémie (<2 %) comme l'Europe de l'Ouest ou l'Amérique du Nord; des zones de prévalence moyenne (2 à 7 %) comme l'Afrique du Nord ou l'Europe de l'Est et enfin des zones de forte endémie (>8 %) comme l'Afrique de l'Ouest ou l'Asie du Sud-Est (figure 1) ([Alter, 2003](#)). Les différents niveaux de séroprévalence de l'HBV peuvent s'expliquer par le contexte socioéconomique et de vaccination. Par exemple, le taux de prévalence est de 0,7 % sur l'île de la Réunion alors qu'en Afrique Subsaharienne, il se rapproche de 30 % dans certaines régions en raison, entre autres, de transmissions très fréquentes entre la mère et

l'enfant, durant la petite enfance et aussi de l'absence de vaccination ou de mesures de prévention générale.

L'HBV a un potentiel de transmission élevé : bien qu'enveloppé, il est très résistant (il peut survivre jusqu'à 7 jours hors de l'organisme) ([Bond et al., 1981](#)), et il est présent à une concentration élevée dans le plasma et les liquides biologiques ( $10^7$  à  $10^{10}$  UI/mL). Il est ainsi considéré comme 100 fois plus contagieux que le virus de l'immunodéficience humaine (HIV).



**Figure 1 :** Epidémiologie mondiale de l'HBV. Source OMS 2002

Les principaux modes de contamination sont la voie sanguine, la voie sexuelle, la voie périnatale et la voie horizontale ([Pol, 2006](#)) :

- la transmission par voie sanguine est observée surtout après piqûre volontaire ou accidentelle. L'utilisation de seringues ou de matériels non désinfectés est responsable de la contamination des toxicomanes par voie veineuse. Les piqûres accidentelles concernent le personnel médical et paramédical. Le risque est plus élevé lors de piqûres directes ou l'effraction cutanée avec matériel souillé de sang infecté, mais la projection de liquides infectés sur des égratignures, les muqueuses ou les yeux sont également contaminantes. En France, la contamination par transfusion sanguine a pratiquement disparu depuis la mise en place du dépistage systématique de l'AgHBs en 1971. D'autres circonstances de transmission, plus rares, existent néanmoins : tatouages ou piercing, soins dentaires, acupuncture, scarifications.
- la transmission sexuelle conduit à considérer l'hépatite B comme une authentique maladie sexuellement transmissible. Les sujets ayant des comportements à risque sur le plan sexuel (homosexuels, bisexuels, hétérosexuels à partenaires multiples) en sont plus particulièrement la cible.
- la transmission verticale, de la mère à l'enfant, se fait principalement lors du passage dans la filière génitale. Le risque est proche de 90% si la mère est AgHBe positive, avec une charge plasmatique virale élevée, et évalué à 20% dans le cas contraire.
- la transmission horizontale, de personne à personne, se fait par l'intermédiaire des liquides organiques potentiellement contagieux, et principalement par la salive, lors de contacts répétés de proximité : entre personnes de la même famille ou

vivant sous le même toit, d'enfant à enfant, ou en institution. En revanche, l'allaitement maternel ne serait pas cause de transmission du virus.

Dans les régions de faible endémie, l'infection se fait surtout à l'âge adulte, par voie sexuelle et sanguine, par toxicomanie intraveineuse (IV) ou intranasale (IN). Elle est asymptomatique chez 80% des individus. Dans 20% des cas, une hépatite aiguë peut survenir après une période d'incubation allant de 1 à 6 mois. Excepté les rares cas d'hépatite fulminante (1/1000 environ, requiert une transplantation en urgence), 90 à 95% des patients résolvent leur infection. Cinq à 10% deviendront chroniquement infectés.

Dans les régions de forte endémie, la transmission est principalement périnatale ou horizontale, évolue vers l'infection chronique dans plus de 80% des cas.

### **1.1.3 Organisation génétique de l'HBV**

Le génome de l'HBV est constitué d'un ADN circulaire, partiellement double brin comportant en moyenne 3200 paires de bases. Compte tenu de sa petite taille, le génome viral est très compact. Il comporte 4 phases ouvertes de lecture (Open Reading Frame, ORF) qui sont chevauchantes ([Seeger and Mason, 2000](#)), et des régions régulatrices (2 enhanceurs et 4 promoteurs) (figure 2).



# Génome et ARN du VHB

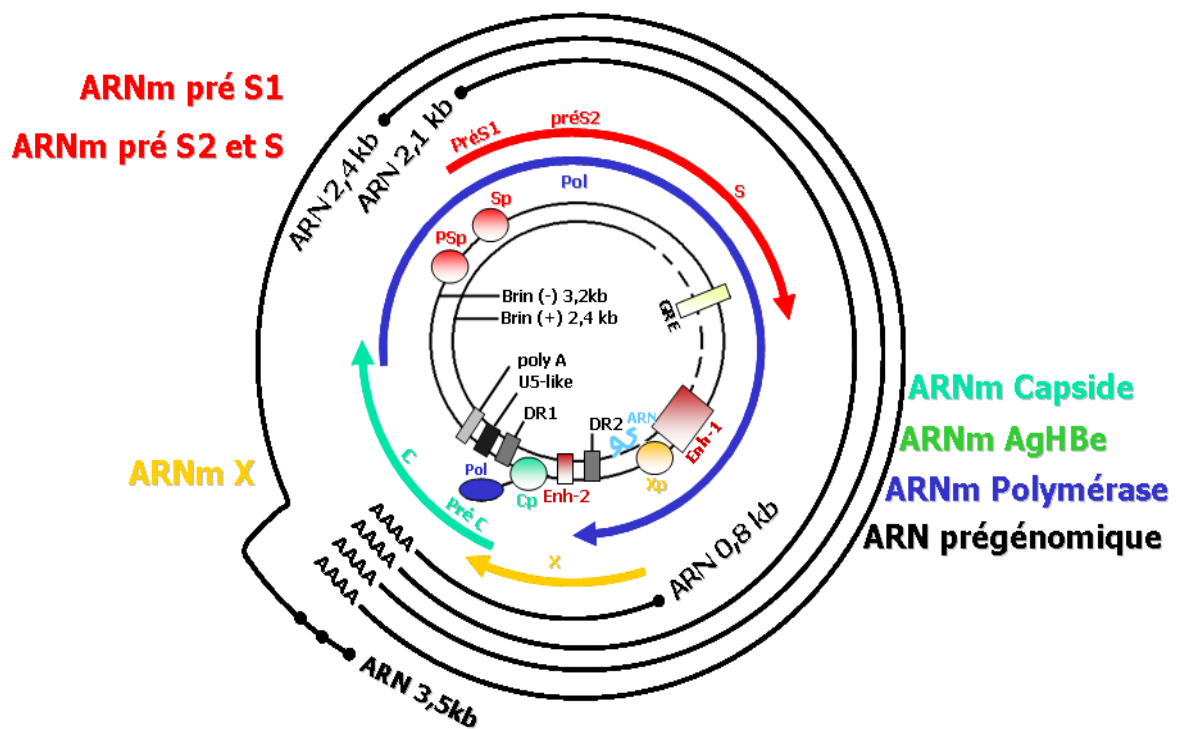


Figure 2 : Génome de l'HBV. ORF S, C, P et X.

### **1.1.3.1 L'ORF S**

Elle est constituée par 3 régions pré-S1, pré-S2 et S, chaque région possédant un site d'initiation en phase en 5', l'extrémité 3' étant commune. Les codons d'initiation des protéines M et L sont situés respectivement 165 et 489 nucléotides en amont du site d'initiation de la protéine S. L'ORF S code pour les 3 protéines d'enveloppe LHBs (389 ou 400 aa selon le sous-type), MHBs et SHBs. Les 3 protéines sont retrouvées dans les particules de Dane de 42 nm de diamètre. SHBs est la plus abondante. L et M sont présentes à peu près en même quantité et représentent 30% de l'enveloppe virale (ratio S/M/L = 4/1/1). Les autres types de particules contiennent surtout de la protéine S.

### **1.1.3.2 L'ORF C**

Elle possède 2 régions pré-C et C codant respectivement pour la protéine du Pré Core et la protéine du core (ou de capsid AgHBc). La protéine Pré Core est le précurseur de l'AgHBc. Cette protéine possède tous les résidus de l'AgHBc plus 29 acides aminés supplémentaires en N-terminal (Nt). L'AgHBc est sécrété sous forme soluble et serait impliqué dans les phénomènes de tolérance immunitaire. La protéine « core » s'assemble pour former une capsid icosaédrique.

### **1.1.3.3 L'ORF P**

Elle recouvre près de 80% du génome, et code pour la polymérase virale, de 830 aa (environ 90kDa). Cette enzyme est constituée de deux domaines principaux reliés par une région espaceur ([Nassal, 2008](#)). Le domaine amino-terminal, appelé TP (pour Terminal Protein), joue un rôle essentiel dans la reconnaissance et la fixation à l'ARN pré-génomique et dans l'initiation de la synthèse du brin d'ADN de polarité négative (Tyr63). La région espaceur (150 aa) permet d'apporter une certaine flexibilité aux deux domaines N et C-

terminaux, mais sa séquence peut être variable. La région carboxy-terminale possède l'activité polymérase et transcriptase inverse, dans sa région proximale, et une activité RNase H dans sa région toute distale. La région Pol/RT est elle-même divisée en plusieurs domaines catalytiques. Le domaine C contient le site catalytique YMDD commun à toutes les RT. Cependant, la Polymérase de l'HBV n'a pas encore été cristallisée.

#### **1.1.3.4 L'ORF X**

Elle code pour la protéine X, nécessaire pour l'établissement de l'infection *in vivo*, mais pas indispensable à la réplication dans des cellules transfectées ([Chen et al., 1993](#)) ([Zoulim et al., 1994](#)). Les virus aviaires ne possèdent pas de gène X, même si des comparaisons de séquences suggèrent que ce gène pourrait avoir été présent à un moment de l'évolution de ces virus ([Netter et al., 1997](#)). La protéine X peut transactiver la transcription de certains gènes viraux ou cellulaires. Elle est impliquée dans les événements d'intégration du génome HBV dans le génome cellulaire. La protéine X ne se lie pas directement à l'ADN, son action sur la transcription de gènes est donc indirecte, via des interactions protéine-protéine ([Diao et al., 2001](#)).

#### **1.1.3.5 Les promoteurs et les enhancers**

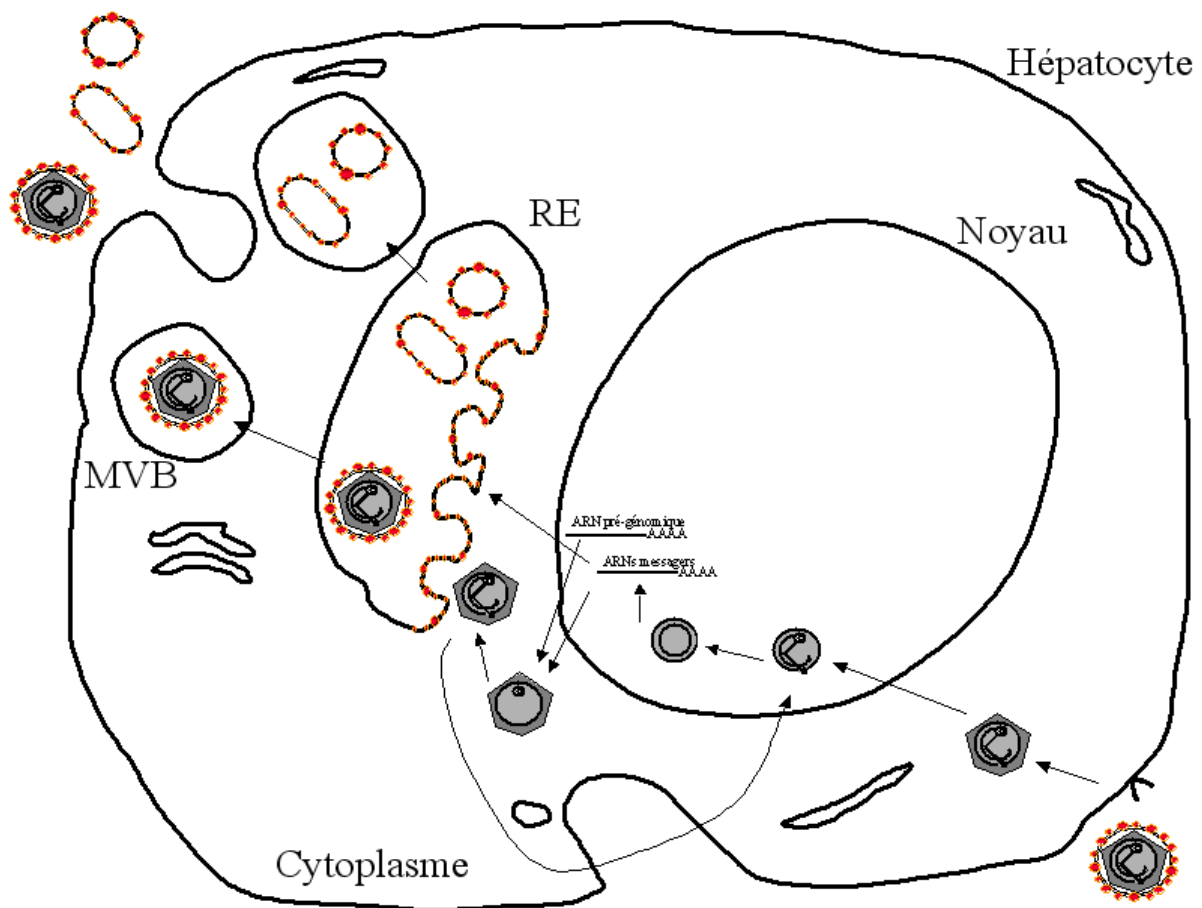
La régulation de la transcription se fait grâce à quatre promoteurs et deux enhancers dont les séquences sont conservées. Ces séquences possèdent de nombreux sites de liaison à des facteurs de transcription ubiquitaires ou spécifiques du foie, ces derniers contribuant au tropisme hépatique de l'HBV.

### 1.1.4 Cycle viral de l'HBV

La particule de Dane, d'un diamètre de 42nm, est la seule particule HBV infectieuse [Dane et al. \(1970\)](#). Le mécanisme de réplication des *Hepadnavirus* – synthèse d'un génome à ADN circulaire, partiellement double brin, par transcription inverse à partir d'un intermédiaire à ARN appelé pré-génome – a été bien caractérisé par diverses études biochimiques. Au contraire, les premières étapes du cycle viral (l'entrée, la libération puis la libération du génome au noyau de la cellule), sont encore mal comprises ([Seeger and Mason, 2000](#)) (figure 3).

#### 1.1.4.1 Infection : attachement et pénétration

Les hépatocytes sont la cible principale de la réplication virale. Pourtant, des études, principalement réalisées avec le virus DHBV, ont montré que d'autres types cellulaires, par exemple les îlots endocrines du pancréas, la rate ou des cellules de l'épithélium proximal tubulaire du rein, pouvaient accueillir une réplication virale ([Halpern et al., 1983](#)) ([Jilbert et al., 1987](#)). Le cycle de réplication débute par la reconnaissance spécifique, par une protéine d'enveloppe de l'HBV, d'un ou de plusieurs récepteur(s) hépatocytaire(s), qui n'a (n'ont) pas encore été identifié(s). Même si plus d'une dizaine de protéines cellulaires peuvent lier l'AgHBs (annexine V, récepteur des IgA, apolipoprotéine H, asialoglycoprotéine, carboxypeptidase D, ...), on ne sait toujours pas lequel(s) est (sont) impliqué(s) in vivo dans l'attachement et les premières étapes du cycle intracellulaire ([Urban et al., 2010](#)).



**Figure 3 :** Cycle de réplication de l'HBV.

Il est clairement démontré que la présence de la protéine LHBs, et plus précisément les 75 aa N-terminaux de la région préS1, est indispensable à la fixation virale ([Le Seyec et al., 1999](#)) ([Blanchet and Sureau, 2007](#)).

La protéine MHBs contient un site de liaison à l'albumine humaine polymérisée, et cette propriété a été proposée comme mécanisme d'attachement indirect des enveloppes de l'HBV/HDV aux hépatocytes. Cependant, la protéine MHBs n'est pas nécessaire à l'infectiosité des particules HDV ([Sureau et al., 1994](#)).

En utilisant l'HDV comme modèle, l'équipe de C. Sureau a montré que certains résidus de la boucle antigénique de SHBs, entre les aa 119 et 128, sont également essentiels pour l'infectivité des virions HBV/HDV ([Salisse and Sureau, 2009](#)) ([Abou-Jaoude et al., 2007](#)). Les ponts disulfures au niveau de la boucle antigénique de SHBs, qui stabilisent l'enveloppe virale, doivent probablement être réduits lors de l'entrée du virion, à une étape postérieure à l'attachement de la particule.

Le mécanisme de pénétration (par endocytose ou fusion membranaire) n'est pas encore élucidé. Elle aboutit à la libération sous forme intacte de la capsid virale dans le cytoplasme. D'après Stoeckl, il s'agirait d'une endocytose liée aux récepteurs. Une fois internalisée dans un endosome, il y aurait démasquage d'un TLM (translocation motif, aa 148 à 161) grâce à l'action de protéases endosomales, et libération de l'HBV dans le cytosol (ce n'est pas une fusion des enveloppes) ([Stoeckl et al., 2006](#)).

#### **1.1.4.2 Import nucléaire**

La capsid virale est adressée vers le noyau cellulaire, dans lequel le complexe ADN viral/polymérase est libéré.

La capsid contenant l'ADN génomique est libérée dans le nucléoplasme et le désassemblage s'y déroule, indépendamment des Ran (Ras-related nuclear protein) ([Rabe et](#)

[al., 2003](#)). L'interaction ADN-capside est plus faible en cas d'ADN double brin (ou partiellement double brin) qu'en cas d'ADN simple brin. Le désassemblage des capsides matures (contenant l'ADN partiellement double brin) pourrait être de ce fait, facilité et libérerait l'ADN génomique libre dans le nucléoplasme ([Roseman et al., 2005](#)). Les capsides contenant des génomes immatures (ARN ou ADN simple brin), qui peuvent être importées dans le NPC, sont retenues dans le « nuclear basket » et le génome immature n'est pas relâché ([Rabe et al., 2003](#)).

#### **1.1.4.3 Formation de l'ADNccc**

Le génome viral est à ce moment sous la forme RC-ADN (pour relaxed circular DNA) : l'ADN est partiellement double brin (le brin (-) est complet et le brin (+) est incomplet, circulaire, la Polymérase est liée de façon covalente à l'extrémité 5' du brin (-) ; l'extrémité 5' du brin (+) contient un oligonucléotide ARN (issu de l'ARN<sub>pg</sub>), ayant servi à la synthèse du brin (+).

La conversion du génome viral RC-ADN en ADNccc (pour ADN circulaire covalent clos) est détectée dans les 24h suivant l'inoculation virale ([Mason et al., 1983](#)) ([Tagawa et al., 1986](#)). La transformation en ADNccc fait intervenir des enzymes de réparation de l'ADN de la cellule hôte, mais le rôle de l'ADN polymérase virale n'est pas formellement exclu.

L'ADNccc, qui possède toute l'information génétique de l'HBV, persiste tout au long de la vie de l'hépatocyte ; il ne serait pas perdu au cours de la division cellulaire. On peut retrouver jusqu'à 50 copies de cet ADNccc dans une cellule infectée, sous forme de mini-chromosomes liés à des histones ([Zhu et al., 2001](#)) ([Bock et al., 2001](#)) .

#### 1.1.4.4 Expression des gènes viraux

La transcription du génome viral est effectuée, à partir de la matrice ADNccc, par l'ARN polymérase cellulaire de type II. Quatre ARN principaux de taille différente sont produits, partageant tous le même signal de polyadénylation en 3' (voir figure 2):

- un ARNm de 0,8 kb, codant pour la protéine X
- un ARNm de 2,4, codant pour la protéine d'enveloppe LHBs
- un ARNm de 2,1 kb, codant pour les protéines d'enveloppe MHBs et SHBs
- les ARN de 3,5 kb : qui sont ARNm pour la capsid, l'AgHBe et la polymérase mais aussi l'ARN pré-génomique. Ces ARN sont plus grand que le génome du fait d'une répétition en 3' des régions DR1 et epsilon.

L'expression des gènes viraux est contrôlée par les quatre promoteurs eux-mêmes activés par les deux enhancers viraux 1 et 2. Il existe également une régulation au niveau traductionnel.

Les ARN formés sont coiffés en 5' et possèdent une queue poly-A en 3'. Les transcrits majeurs ne sont pas épissés. Une séquence PRE (pour Post Transcriptional Regulatory Element), située à leur extrémité 3', en épingle à cheveux, facilite l'export efficace de ces ARN ([Huang and Liang, 1993](#)) ([Huang and Summers, 1994](#)) ([Huang and Yen, 1995](#)) . Les protéines virales sont synthétisées dans le cytoplasme, grâce à la machinerie cellulaire.

Les ARN de 3,5 kb servent à la fois à la synthèse de l'AgHBe, des protéines du core et de la polymérase virale, dans un cadre de lecture différent. La prise en compte du cadre de lecture de la polymérase apparaît peu efficace comparée à celle du core ([Ou et al., 1990](#)). Les capsides virales étant formées à partir de 180 à 240 sous-unités d'AgHBc et de seulement 1 (ou 2) molécule (s) de polymérase. L'ARN pré-génomique pourrait permettre la traduction de 200 à 300 peptides de core avant de déclencher la traduction d'une polymérase. Celle-ci se



fixe sur une structure en boucle de l'ARN, en 5', appelée epsilon ( $\epsilon$ ), ce qui stopperait toute traduction ultérieure de l'ARN prégénomique. Il existe probablement des molécules Pol en excès, non associées au génome viral.

#### **1.1.4.5 Synthèse des particules virales**

La synthèse des protéines de capsid et de la polymérase permet l'encapsidation d'un complexe ARN prégénomique - polymérase, formant une capsid immature ([Bartenschlager et al., 1990](#)) ([Hirsch et al., 1990](#)). A ce stade, la région C-terminale de HBc est localisée dans la lumière de la capsid et liée à l'ARN prégénomique. La spécificité de l'encapsidation d'un ARN prégénomique HBV est médiée par la polymérase.

Une capsid comporte 90 (symétrie T=3) ou 120 (symétrie T=4) dimères de protéine de capsid. Les capsides contenant 120 dimères sont majoritaires parmi les particules infectieuses ([Roseman et al., 2005](#)). La phosphorylation de la protéine HBc en C-terminal, par une protéine kinase enfermée dans la capsid néo-formée, est essentielle à la maturation des génomes ([Kann et al., 1999](#)), et à l'exposition de la région C-terminale de la capsid à sa surface.

#### ***Réaction de transcription inverse***

La structure epsilon, très conservée parmi les Hepadnavirus, présente en 5' de l'ARNpg, est nécessaire pour l'encapsidation du complexe ARNpg/Pol ([Junker-Niepmann et al., 1990](#)). La Polymérase doit être activée par des protéines de choc thermique (Hsp40/Hsp70) ; la modification structurelle de la Pol permet sa fixation à l'epsilon. Suite à la fixation epsilon-Pol, les 2 entités sont modifiées et l'initiation de la synthèse de l'ADN peut débuter ([Beck and Nassal, 2007](#)).

En utilisant la boucle de l'épsilon comme matrice, une amorce de 4 nucléotides est synthétisée. Ce brin d'ADN naissant est transféré vers une séquence complémentaire à l'extrémité 3' de l'ARN pré-génomique (sur la région DR1 en 3'). Ce transfert est facilité par le rapprochement dans l'espace, des extrémités 5' et 3' de l'ARNpg, probablement médié par des protéines cellulaires, dont eIF-4G ([Mangus et al., 2003](#)). La synthèse du brin complet, de polarité négative, peut alors se poursuivre.

Simultanément, le brin d'ARN matrice est détruit grâce à l'activité RNase H de l'enzyme (sauf les 15 à 18 nt en 5' de l'ARNpg, qui serviront d'amorces pour la synthèse du brin (+)). Le brin d'ADN de polarité négative sert lui-même de matrice pour la synthèse du brin complémentaire de polarité positive. Une deuxième translocation de la polymérase HBV vers le DR2 en 3' est nécessaire. Cette synthèse du brin positif est incomplète. Le génome viral ainsi formé est partiellement double brin, avec un brin positif de taille variant de 50 à 80% environ de celle du brin négatif. Enfin, le génome est circularisé, ce qui implique une 3<sup>ème</sup> translocation de la polymérase.

La nucléocapside néoformée mature (exposant son NLS) peut être routée de nouveau, comme au début du cycle viral, vers le noyau, et participe ainsi à la synthèse de nouvelles molécules d'ADNccc et donc à l'amplification de l'infection. Cette amplification se retrouve principalement au stade Précoce de l'infection, lorsque la concentration en protéines d'enveloppe est faible, ce qui laisse supposer un phénomène régulé.

Les protéines d'enveloppe sont elles, adressées au réticulum endoplasmique puis vers les voies de sécrétion. Les protéines SHBs peuvent être sécrétées sous forme de particules sous-virales (SVP) ([Patent et al., 2009](#)). Les SVP sphériques contiennent surtout de la protéine SHBs, alors que les filaments incluent une certaine quantité de protéines LHBs. Les dimères de SHBs sont stabilisés par des ponts di-sulfure créés par des Protein Disulfide Isomerases (PDI) ; puis il y a formation de filaments dans l'espace périnucléaire (appartenant au RE) qui

sont transférés, dans des vésicules dérivées du RE, vers le ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment). Une fois dans le ERGIC, les filaments adoptent une structure plus relâchée et sont coupés en vésicules sphériques avant d'être sécrétés. A noter qu'il n'y aurait pas de bicouche lipidique dans les SVP de SHBs ([Gilbert et al., 2005](#)).

La maturation et la sécrétion des particules HBV se fait au niveau d'endosomes tardifs (les multivesicular bodies, MVB). Des protéines ESCRT I, II et III sont recrutées du côté cytosolique de la membrane des MVB. Les protéines HBs sont situées dans cette même membrane, et réagissent avec les nucléocapsides. Il y a bourgeonnement des particules HBV dans la lumière des MVB, puis ces particules suivent la voie d'exocytose. Secondairement, d'autres peptides LHBs subissent un changement de conformation pour que des épitopes de LHBs soient exprimés à la surface du virion.

### **1.1.5 Particules virales**

Dans le sérum d'un patient infecté par l'HBV, on distingue deux types de particules virales en microscopie électronique ([Dane et al., 1970](#)) (figure 4) :

- des particules infectieuses de 42 nm (particules de Dane, du nom de celui qui les a décrites). Elles sont constituées d'une enveloppe formée d'une bicouche phospholipidique provenant de la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule infectée dans laquelle sont insérées trois glycoprotéines virales spécifiques de tailles différentes nommées, petite (SHBs), moyenne (MHBs) et grande (LHBs) protéines d'enveloppe du virus. La capside mesure 30 nm, est de type icosaédrique, et est composée de dimères de la protéine HBc stabilisés par 2 ponts disulfures. Elle contient le

génomique ainsi qu'une copie de la polymérase virale (figure 5). La concentration peut dépasser  $10^9$  particules/mL.

- des particules virales non-infectieuses (billes et bâtonnets) de 22 nm de diamètre. Elles sont formées par auto-assemblage de protéines d'enveloppe (surtout SHBs), et sont sécrétées, par une voie propre (différente de celle des virions HBV) et en très large excès par rapport aux virions complets ([Patient et al., 2007](#)).

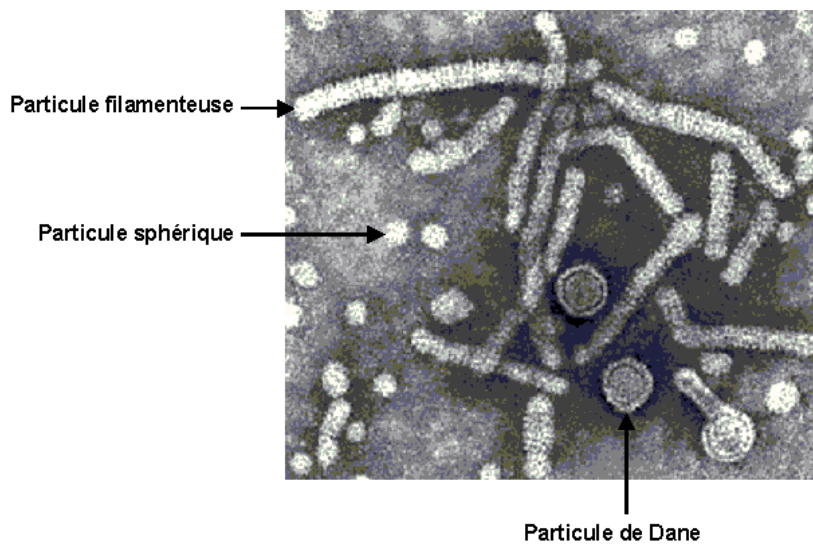


Figure 4 : Photographie en microscope électronique des particules virales de HBV

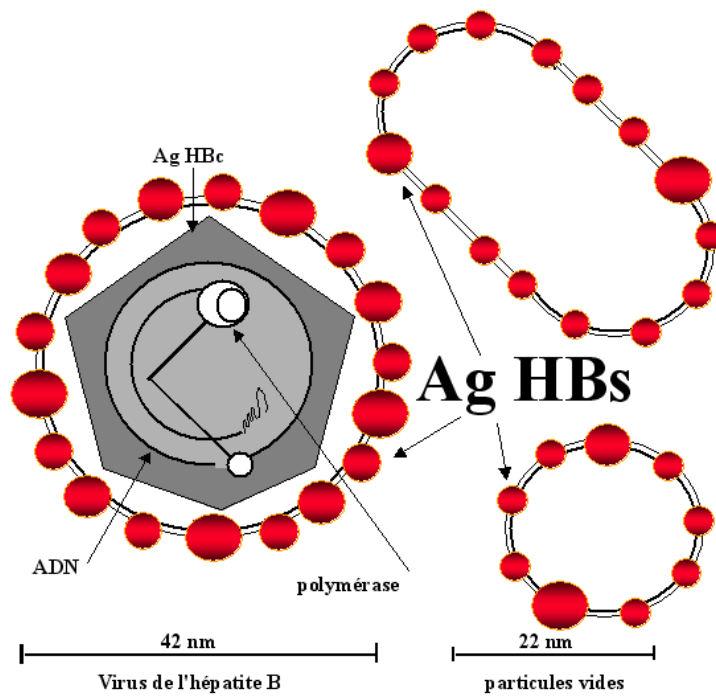


Figure 5 : Structure des particules HBV.

## 1.1.6 Bases moléculaires de la variabilité génétique

L'HBV est caractérisé par une très grande variabilité génétique. Celle-ci est un résultat de deux phénomènes différents. Le premier type de variabilité peut être qualifié de polymorphique ou génotypique. Le second type, la variabilité phénotypique, est la sélection de mutations qui altèrent les propriétés du virus face à une pression immunologique ou pharmacologique.

### 1.1.6.1 Les erreurs de la polymérase virale

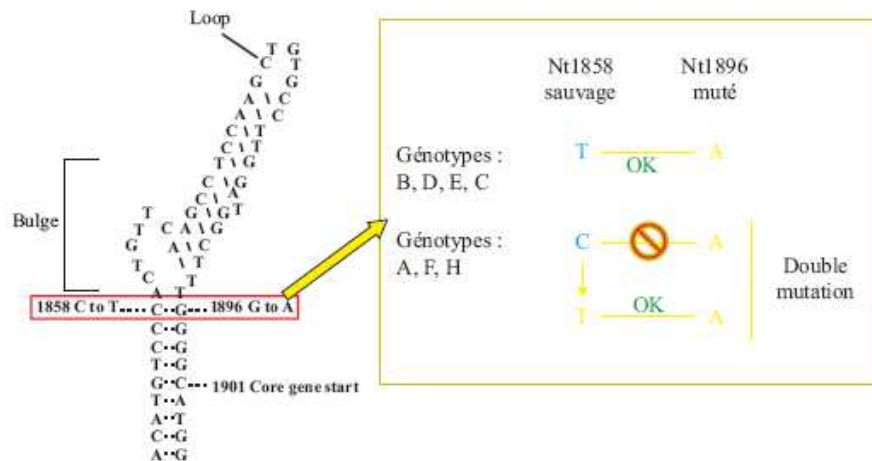
La réplication de l'HBV s'effectue à des taux très élevés. En effet, jusqu'à  $10^{11}$  particules virales peuvent être produites par jour. La réplication du génome viral de l'HBV comprend une étape de transcription inverse grâce à la polymérase virale. Cette polymérase ne possède pas d'activité 3' → 5' exonucléasique permettant la réparation des erreurs au cours de la synthèse du brin ADN négatif. Ainsi, le taux de réplication élevé et l'accumulation des erreurs de la polymérase virale (estimée à 1 erreur par jour et par site toutes les  $10^4$  bases incorporées) rendent compte de cette grande variabilité génétique de l'HBV. Cependant, la complexité de l'organisation génétique de l'HBV avec le chevauchement des gènes et l'imbrication de parties régulatrices et structurales et la stratégie de réplication de l'HBV font que la majorité des mutations ne sont pas viables ([Ganem, 2001](#)) ([Mizokami et al., 1997](#)). Donc, chez le patient chroniquement infecté, plusieurs variants distincts mais génétiquement très proches se côtoient définissant ainsi une distribution en quasi-espèce. D'autre part, des mutants peuvent être sélectionnés et devenir les virus majoritaires sous la pression immunologique ou médicamenteuse.

### **1.1.6.2 La pression immunologique ou médicamenteuse**

La pression immunologique (ou médicamenteuse quand un traitement est institué) va entraîner l'émergence et la sélection des souches les mieux adaptées aux conditions environnementales dans lesquelles les virus évoluent. Il y aura compétition entre les différentes populations virales. Une population virale, appelée virus « sauvage » ayant un avantage sélectif par rapport aux autres souches virales devient majoritaire.

Des mutations spécifiques ont été bien identifiées, comme les mutations Pré C, liées à la pression des anticorps anti-HBe. On distingue des mutations ponctuelles dans le promoteur du gène Pré C, en position 1762 (A1762T) et 1764 (G1764A) et la mutation codon stop en position 1896 (G1896A). Ces mutants du BCP et du gène Pré C se traduisent par l'émergence des souches incapables de produire l'AgHBe, mais aussi associées à une plus grande sévérité de la maladie hépatique. Pour certains auteurs ces mutants seraient liées à l'histoire naturelle de la maladie, car ils sont en effet retrouvés chez 50 à 90% des patients infectés de façon chronique selon les études ([Ganne-Carrie et al., 2006](#)). Des études récentes relatent une prévalence élevée de mutants PC chez les donneurs de sang nouvellement dépistés AgHBs positifs ([Biswas et al., 2009](#)). Ainsi, les données de la littérature montrent que les mutants PréC et BCP ont probablement un impact dans l'histoire naturelle de l'hépatite B. Mais les études publiées sont souvent limitées par un effectif réduit des populations ciblées et la codominance fréquente de deux génotypes (A/D dans les études européennes et B/C pour les études asiatiques), rendant les résultats parfois contradictoires ([Ducancelle et al., 2011a](#)). Les mutants Pré C sont plus fréquemment retrouvés chez les patients infectés par un génotype D, B, C ou E que A, F ou H. Cette restriction à certains génotypes de l'HBV est expliquée par la structure secondaire en tige boucle de l'ARN prégénomique du virus. Le nucléotide en position 1896 interagit avec le nucléotide 1858 pour former une structure tige-boucle nécessaire à l'encapsidation du génome viral. La mutation G1896A a un effet stabilisateur sur

les génotypes B, D, E et C qui possèdent un T en position 1858, en créant un appariement A-T stabilisant la structure secondaire. En revanche, la présence d'une cytosine en 1858 pour les génotypes A, F et H va déstabiliser la structure secondaire du fait d'un mésappariement C-A si la mutation G1896A apparaît. Il faudrait une seconde mutation en position 1858 (C→T) pour stabiliser la structure tige-boucle ([Ducancelle et al., 2011b](#)). (figure 6)



**Figure 6:** La structure secondaire en tige boucle de l'ARN pré-génomique du virus de l'hépatite B. ([Ducancelle et al.,2011b](#))

De même, des mutants d'enveloppe, dits « mutants d'échappement à la vaccination » ont été décrits. Parmi ceux-ci, la plus fréquemment décrite est la mutation G145R, associant une authentique infection HBV avec AgHBs négatif (quoique les techniques de dernière génération soient capables de détecter la majorité d'entre elles) avec Ac anti-HBs positifs mais aussi avec une charge virale positive par des techniques sensibles.

Enfin, les mutants d'échappement au traitement par analogues de nucléosides ou de nucléotides constituent un problème récent. Des mutations de plus en plus nombreuses sont identifiées, sélectionnées par ces différentes drogues, entraînant parfois des résistances croisées pouvant aboutir à des impasses thérapeutiques.



## 1.1.7 Génotypes et sous génotypes HBV

### 1.1.7.1 Définitions

Huit génotypes différents, désignés par les lettres de A à H, ont été déterminés. Deux génotypes différents sont caractérisés par définition, par une divergence dans la séquence nucléotidique complète de plus de 7,5% ([Miyakawa and Mizokami, 2003](#)) ([Norder et al., 2004](#)) ([Kramvis et al., 2005](#)).

Par la suite, des sous génotypes au sein de la plupart des différents génotypes, définis par une divergence dans la séquence nucléotidique complète de plus de 4%, ont été individualisés.

### 1.1.7.2 Classification et répartition géographique

Dans un travail publié en 1988, Okamoto et son équipe ont comparé les génomes complets de 18 souches virales, et ont proposé une classification en 4 groupes, nommés A à D, basée sur une divergence inter-groupe de plus de 8% ([Okamoto et al., 1988](#)) ([Miyakawa and Mizokami, 2003](#)). Ces "groupes génomiques" ont par la suite pris la dénomination de "génotypes".

Au début des années 90, des souches isolées de patients originaires d'Afrique de l'Ouest (Sénégal) et d'Amérique du Sud (Colombie, Brésil), ont été classées dans 2 nouveaux génotypes, appelés HBV/E et HBV/F ([Norder et al., 1992](#)) ([Naumann et al., 1993](#)). En 2000, Stuyver et collaborateurs ont étudié 121 souches isolées chez des porteurs chroniques de l'HBV en France et aux Etats-Unis. Ils ont décrit, chez 13 patients, un nouveau génotype viral, appelé HBV/G ([Stuyver et al., 2000](#)). Récemment, une analyse plus fine de séquences complètes de souches, isolées chez des patients d'Amérique Centrale, classées initialement au sein du génotype HBV/F, mais formant une branche bien séparée sur les arbres

phylogénétiques, a conduit à la création d'un nouveau génotype désigné HBV/H ([Arauz-Ruiz et al., 2002](#)).

Tout récemment, le génotype HBV/I a été proposé, quoique discuté pour des isolats du Vietnam et du Laos ([Olinger et al., 2008](#)) ([Tran et al., 2008](#)), et une souche a été proposée comme prototype du génotype HBV/J chez une patiente du Japon ([Tatematsu et al., 2009](#)).

Les différents génotypes ont une taille génomique variable allant de 3182 nucléotides (génotype HBV/D) à 3248 nucléotides (génotype HBV/G), du fait d'insertions ou de délétions observées dans leurs séquences.

Un niveau de variabilité génétique supplémentaire a été mis en évidence, tout d'abord au sein du génotype HBV/A, puis dans d'autres génotypes ([Bowyer et al., 1997](#)). Des sous-génotypes, définis par une divergence dans la séquence nucléotidique complète de plus de 4% ont été individualisés.

Génotypes et sous-génotypes sont caractérisés par une distribution géographique précise (figure 7). Actuellement, du fait des grandes vagues de migrations humaines, la présence de souches virales de différents génotypes reflète l'origine des migrants dans les nouvelles métropoles urbaines d'Europe de l'Ouest et du Nord notamment.

La définition des génotypes et sous génotypes fait encore l'objet de discussions au sein de la communauté scientifique. Kramvis et collaborateurs proposent la valeur de 7,5% de divergence dans la séquence complète pour la définition du génotype. De même, plus récemment Pourkarim et collaborateurs ont proposé une nouvelle classification dans les sous génotypes, en proposant notamment la prise en compte de valeurs de bootstrap élevées lors de la réalisation des arbres phylogénétiques ([Pourkarim et al., 2010](#)) ([Kramvis et al., 2008](#))(figure 8). Seules des études sur de larges cohortes dans diverses régions du monde permettront de valider telle ou telle proposition.



**Figure 7:** Répartition géographique des différents génotypes de l'HBV  
(d'après Schaeffer World J Gastroenterol 2007).([Schaefer, 2007](#))

### **1.1.7.2.1 Génotype A**

Le génotype A, relativement ubiquitaire, est retrouvé en Europe, en Afrique, en Inde et en Amérique du Nord. Il est généralement constitué de 3221 nucléotides (nt). Il se subdivise en 2 groupes majeurs : A1 (ou Aa), retrouvé en Afrique et en Asie, et A2 (ou Ae), présent surtout en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord ([Bowyer et al., 1997](#)) ([Kramvis et al., 2002](#)) ([Kimbi et al., 2004](#)) .

Au niveau moléculaire, les sous-génotypes HBV/A1 et A2 présentent des acides aminés différents aux positions 207 et 209 de la protéine SHBs, respectivement Asn207 et Leu209 ou Ser207 et Val209 ([Norder et al., 1993](#)).

D'autre part, en plus du sous-génotype A1, on retrouve aussi en Afrique le sous-génotype A3 au Cameroun ([Kurbanov et al., 2005](#)), au Bénin ([Fujiwara et al., 2005](#)), au Ghana ([Candotti et al., 2007](#)), en Côte d'Ivoire ([Suzuki et al., 2003](#)), au Gabon ([Makuwa et al., 2006](#)) , en République Démocratique du Congo et au Rwanda ([Hubschen et al., 2009](#)) ; et les sous génotypes A4 et A5 ont été décrits respectivement, au Mali et au Nigeria ([Olinger et al., 2006](#)). Le sous-génotype A6 a été trouvé chez 3 patients belges originaires du Rwanda et du Congo, et le sous – génotype A7 a été tout récemment décrit au Rwanda et à l'Ouest du Cameroun ([Hubschen et al., 2011](#)) ([Pourkarim et al., 2011](#))

La grande variabilité du génotype HBV/A en Afrique, de l'ordre de 3,44% en moyenne ([Kramvis et al., 2008](#)), permet de suggérer que ce génotype a probablement évolué en Afrique avant de se propager et d'atteindre le reste du monde ([Hannoun et al., 2005](#)).

### **1.1.7.2.2 Génotypes B et C**

L'Asie concentre la plus grande majorité de porteurs chroniques de l'HBV. En effet selon l'OMS, 78% des 400 millions de porteurs chroniques vivent en Asie. Les souches virales circulant en Asie (Vietnam, Thaïlande, Indonésie, en Chine et au Japon) sont quasi exclusivement des génotypes B et C.

Tout comme le génotype HBV/A, le génotype HBV/B présente une grande variabilité intra-génotypique de l'ordre de 3,33% en moyenne ([Kramvis et al., 2008](#)).

Ce génotype est maintenant subdivisé en 8 sous-génotypes (B1 à B8), de répartition géographique particulière : B1 (anciennement Bj) au Japon ([Sugauchi et al., 2002](#)), B2 en Chine, B3 au Vietnam et au Cambodge, B5 aux Philippines ([Nagasaki et al., 2006](#)), B6 chez la population Inuit du Canada ([Osiowy et al., 2006](#)), B4, B7 et B8 en Indonésie ([Utama et al., 2009](#)) ([Mulyanto et al., 2009](#)). A la différence des sous-génotypes B1 et B6, les sous-génotypes B2, B3, B4 et B5 présentent une recombinaison avec le génotype HBV/C au niveau des régions Pré Core et core.

La variabilité intra génotypique du génotype C est en moyenne de l'ordre de 3,27% ([Kramvis et al., 2008](#)). Le génotype C est composé à ce jour, de 7 sous-génotypes (C1 à C7) répartis dans plusieurs pays d'Asie. On rencontre le sous-génotype C1 en Thaïlande et au Vietnam tandis que C2 est généralement localisé en Chine, au Japon et en Corée. Mais, C2 a été aussi décrit au Rwanda ([Hubschen et al., 2009](#)) . Le C3 a été découvert en Nouvelle Calédonie et en Polynésie, le C4 chez les aborigènes d'Australie ([Chan et al., 2005](#)), le C5 aux Philippines ([Sakamoto et al., 2006](#)). Enfin, plus récemment C6 ([Lusida et al., 2008](#)) ([Utsumi et al., 2009](#)) et C7 ([Mulyanto et al., 2009](#)) ont été décrits en Indonésie.

Comme pour le génotype B, le génotype C est composé d'un certain nombre de souches recombinantes C/D découvertes en Chine ([Wang et al., 2005](#)) ou au Tibet ([Cui et al., 2002](#)).

### **1.1.7.2.3 Génotype D**

HBV/D est largement distribué, avec une grande prévalence dans une ceinture englobant le pourtour méditerranéen (Europe du Sud et Afrique du Nord), l'Europe de l'Est, le Proche et le Moyen-Orient et l'Inde. On le rencontre également en Afrique du Sud.

D'une taille de 3182 nt, le génotype D présente une délétion de 11 codons dans le gène PréS1. La variabilité intra-génotypique de l'HBV/D est en moyenne de 3,18 % ([Kramvis et al., 2008](#)). Il est composé actuellement de 7 sous génotypes (D1-D7).

Contrairement aux sous-génotypes A, B et C, les sous-génotypes D n'ont pas de répartition géographique bien caractéristique. D1, D2 et D3 sont ubiquitaires. Par exemple, on trouve du D3 en Asie (surtout l'Est de l'Inde), en Afrique du Sud et en Europe ([Banerjee et al., 2006](#)) ([Kimbi et al., 2004](#)). D4 a été décrit en Australie, au Ghana et en Somalie ([Candotti et al., 2007](#)) ([Norder et al., 2004](#)) et D5 en Inde. Plus récemment, D6 a été décrit en Indonésie ([Lusida et al., 2008](#)) et en Irlande ([Laoi and Crowley, 2008](#)), et D7 en Tunisie et au Maroc ([Meldal et al., 2009](#)) ([Khelifa and Thibault, 2009](#))

### **1.1.7.2.4 Génotype E**

Le génotype HBV/E, relativement proche génétiquement du génotype HBV/D est retrouvé presque exclusivement en Afrique subsaharienne et de l'Ouest, ainsi que dans les régions de forte migration africaine.

En dépit des fortes migrations africaines issues de la traite négrière et de l'esclavage des 15 au 19<sup>ème</sup> siècles, le génotype E n'a pas été retrouvé, ou seulement de façon très sporadique, aux Antilles et en Amérique du Nord et du Sud, à la différence du génotype HBV/A (sous-génotype HBV/A1) ([Ganne-Carrie et al., 2006](#)) ([Andernach et al., 2009b](#)) ([Motta-Castro et al., 2008](#)) ([Venegas et al., 2008](#)) ([Quintero et al., 2002](#)). Ces données suggèrent que ce génotype E a été introduit dans la population africaine après la période de la traite négrière.

Cependant, dans certaines études, le génotype E a été décrit parfois chez 18% des afro-américains étudiés ([Kato et al., 2004](#)) ([Chu et al., 2003](#)). Il importe de savoir toutefois, qu'après la fin de la traite négrière et de l'esclavage, des migrations importantes de travailleurs d'Afrique et d'Inde ont continué jusqu'au début du 20<sup>ème</sup> siècle.

La diversité génétique intra-génomique moyenne au sein des souches de génotype E est de l'ordre de 1,85% ([Kramvis et al., 2008](#)) ([Mulders et al., 2004](#)) soit l'une des plus faibles observées au sein de différents génotypes de l'HBV. Cependant, cette variabilité génétique semble plus importante au nord qu'au sud de l'Afrique ([Andernach et al., 2009a](#)), indiquant une apparition et une propagation selon un gradient nord sud.

Ces différentes données posent la question de l'émergence du génotype E en Afrique, qui serait donc récente (moins de 200 ans) et des modalités de sa propagation (iatrogénique) jusqu'à devenir aujourd'hui la souche prédominante en Afrique subsaharienne et en Afrique de l'Ouest ([Fujiwara et al., 2005](#)) ([Andernach et al., 2009a](#); [Mulders et al., 2004](#)) ([Kramvis et al., 2005](#)) ([Huy et al., 2006](#)).

#### **1.1.7.2.5 Génotypes F et H**

Les génotypes HBV/F et HBV/H sont les plus divergents génétiquement des autres souches virales (divergence moyenne inter-génotypique de plus de 13%). Ils sont retrouvés dans les populations natives d'Amérique Centrale et du Sud et du Pacifique.

D'une taille de 3215 nucléotides, le génotype HBV/F présente une divergence intra-génomique moyenne de l'ordre de 3,54% ([Kramvis et al., 2008](#)). Le génotype F est composé de 4 sous génotypes (F1 à F4). Le sous-génotype F1 a été localisé en Amérique du Sud et Centrale ([Kato et al., 2005](#)) ([Norder et al., 2004](#)) alors que F2, F3 et F4 ont été principalement décrits en Amérique du Sud ([Mbayed et al., 2001](#)) ([Naumann et al., 1993](#)) ([Devesa et al., 2004](#)) ([Huy et al., 2006](#)).

Le génotype HBV/H a été décrit pour la première fois en Amérique Centrale ([Arauz-Ruiz et al., 2002](#)). Depuis, d'autres souches ont été découvertes au Mexique et au Sud des Etats-Unis. Sa variabilité intra-génomique moyenne est de l'ordre de 1,92% ([Kramvis et al., 2008](#)), et il possède une divergence moyenne de 8.1% avec le génotype HBV/F. Cependant, il possède 16 acides aminés qui lui sont spécifiques dans la polymérase.

#### ***1.1.7.2.6 Génotype G***

Le génotype HBV/G, constitué de 3248 nucléotides, a été décrit dans des groupes particuliers de patients aux Etats-Unis et en France ([Stuyver et al., 2000](#)) ([Norder et al., 2004](#)). Sa prévalence et sa distribution géographique sont mal connues.

Il possède une insertion de 36 nucléotides dans le gène C et 2 codons stop aux positions 2 et 28 de la région Pré C ([Stuyver et al., 2000](#)). L'AgHBc du génotype G possède donc 12 aa supplémentaires ; il ne synthétise pas l'AgHBe en raison du codon stop en position 28 du gène Pré C. Mais le plus souvent, les patients infectés par le génotype G sont également co-infectés par le génotype A, ce qui expliquerait la présence de l'AgHBe chez ces patients ([Kato et al., 2002a](#)). Les gènes S des génotypes G et A montrent une grande similarité de séquence, alors que les séquences génomiques complètes de ces 2 génotypes diffèrent fortement. Parmi tous les génotypes décrits à ce jour, le génotype G est le moins diversifié avec en moyenne seulement 0,82% de divergence intra génomique ([Kramvis et al., 2008](#)).

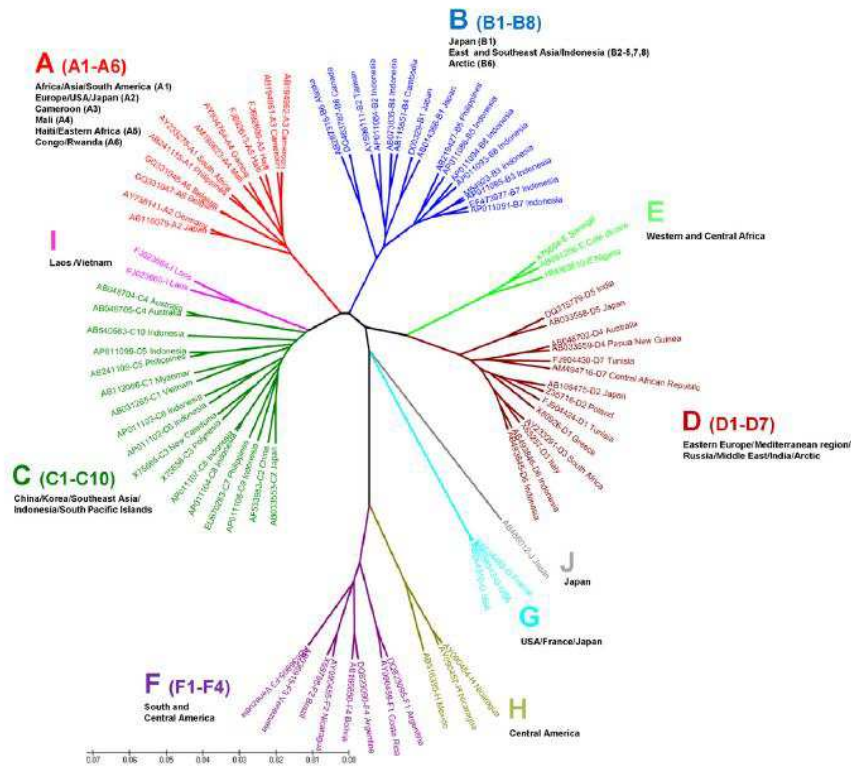


#### ***1.1.7.2.7 Génotypes « I » et « J »***

Tout récemment, 2 nouvelles propositions de génotypes, le génotype HBV/I au Vietnam ([Tran et al., 2008](#)) et au Laos ([Olinger et al., 2008](#)), et le génotype HBV/J au Japon ([Tatematsu et al., 2009](#)) ont été formulées.

Le génotype « I » a été décrit par Tran chez un patient vietnamien souffrant d'une hépatite aiguë. Les analyses phylogénétiques et le programme bootscan du logiciel Simplot ont permis de mettre en évidence l'existence d'un triple recombinant C/A/G ([Tran et al., 2008](#)). Dans la même année, Olinger et associés ont également décrit d'autres séquences phylogénétiquement proches de la séquence produite par Tran et associés et qui permettaient de proposer la classification de ces nouvelles souches en un génotype distinct, le génotype HBV/I ([Olinger et al., 2008](#)). En fait, dès 2000, Hannoun et associés décrivaient 3 souches HBV recombinantes au Vietnam ([Hannoun et al., 2000](#)). Ces souches montrent plus de 98% d'homologie avec celles qui étaient décrites par Tran et associés. Cependant, pour Kurbanov, ces nouvelles souches devraient être classées plutôt comme un nouveau sous-génotype C que comme un nouveau génotype ([Kurbanov et al., 2008](#)).

Le génotype « J » a été récemment décrit au Japon chez une patiente atteinte de carcinome hépatocellulaire. La séquence de ce nouveau génotype n'est pas recombinante et elle est proche des séquences de gibbon et d'orang-outan (respectivement 10,9 et 10,7% de divergence) ([Tatematsu et al., 2009](#)).



**Figure. 8** : UPGMA dendrogram basé sur 79 sequences complètes des isolates de l'HBV representative de tous les génotypes et sougénotypes décrits dans les différentes régions de monde. ([Araujo et al., 2011](#))

### 1.1.7.3 La recombinaison génétique

La recombinaison a été suspectée dès 1977, grâce aux études sérologiques montrant la co-existence de plusieurs sérotypes chez un même patient ([Hess et al., 1977](#)) ([Tabor et al., 1977](#)). Il existe des recombinants intra génotypiques (déplacement de fragments d'ADN au sein d'un même génotype) et de recombinants inter génotypiques (issus du mélange entre différents génotypes). Les recombinaisons inter génotypes impliquent la co-infection par différents génotypes.

Actuellement, des événements de recombinaison génétique ont été décrits pour tous les génotypes, à l'exception du génotype H. Certains recombinants sont même devenus les souches virales majoritaires dans certains pays, tel le recombinant C/D au Tibet ([Cui et al., 2002](#)).

Le mécanisme d'action de la recombinaison demeure inconnu et pour le moment, on ne sait pas à quel stade de la réplication a lieu ce phénomène. En revanche, on a remarqué que les points de cassures étaient le plus souvent localisés aux environs de la région Direct Repeat 1 (DR1, 1640-1900 nt), de la région Pré S1/S2 (3150-100 nt), de la région 3' du gène C (2330- 2450 nt) et enfin de la région 3' du gène S (650-830 nt) ([Yang et al., 2006](#)) ([Simmonds et al., 2005](#)) ([Schaefer, 2007](#)). Il est intéressant de noter que ces points de cassures sont localisés dans des régions hypervariables, permettant donc une certaine flexibilité du génome HBV sans atteinte de la viabilité du virus. Plusieurs hypothèses ont été émises :

- recombinaison durant l'étape de transcription inverse de l'ARN pré génomique (ARN<sub>pg</sub>) par saut de la polymérase d'une molécule à l'autre. Cependant, pour des raisons de compaction, il semble qu'un seul ARN<sub>pg</sub> à la fois soit encapsidé avec la polymérase ([Ganem, 1991](#));

- mise en place simultanée, au sein d'un même noyau hépatocytaire, de 2 groupes d'ADNccc lors d'une co-infection, et échange de fragments par recombinaison lors de la réplication, ou saut lors de la transcription par l'ARN polymérase II.

Des études *in vitro* ont démontré, par ailleurs, que chez le DHBV, la topoisomérase I était capable de transformer l'ADN circulaire relâché (ADN CR) en ADN circulaire covalent clos (ADNccc). cette enzyme est aussi capable de le linéariser et de favoriser l'intégration d'épisomes dans le génome cellulaire ([Pourquier et al., 1999](#)). Comme pour le DHBV, on peut penser que la topoisomérase I jouerait le même rôle au niveau de l'HBV. Toutefois, il a été démontré que l'intégration du génome HBV dans le génome cellulaire se faisait le plus souvent par petits fragments ([Buendia, 1992](#)), ce qui exclut la possibilité d'utiliser cet ADN intégré dans le génome humain comme matrice pour la nouvelle réplication.

Considérant la complexité du génome HBV avec ses 4 cadres de lecture chevauchant et ses séquences régulatrices ou structurelles (essentielle pour la transcription et la réplication virale) imbriquées dans les séquences codantes, toutes ces hypothèses ne nous permettent pas la compréhension parfaite des mécanismes de la recombinaison intra génotypique. Ceci nous permet d'émettre une autre hypothèse selon laquelle, la recombinaison n'est peut-être que le reflet d'une grande capacité de l'HBV à s'adapter aux différents environnements.

## **1.1.8 Impact de la variabilité génétique de HBV sur l'histoire naturelle de l'hépatite virale**

### **1.1.8.1 Histoire naturelle : (figure 9)**

La cellule majeure du foie est l'hépatocyte. Elle constitue 70% des cellules du tissu hépatique. Celui-ci est aussi composé de cellules épithéliales du conduit biliaire, et des cellules de Küpffer. Les hépatocytes sont la cible principale de virus hépatotropes comme l'HBV.

Les hépatocytes ont une capacité de prolifération intense en réponse à une atteinte du foie. Dans des conditions normales, un hépatocyte a une demi-vie de 6 à 12 mois. En cas de besoin, la quasi-totalité de la population cellulaire peut entrer en cycle et se diviser, permettant une restauration de la masse hépatique en quelques jours après une hépatectomie de plus de 50% par exemple.

#### ***1.1.8.1.1 Infection aiguë***

Lors d'une infection aiguë par l'HBV, on assiste, au niveau du foie, à la succession de 3 phases ([Hézode, 2010](#)):

- une première phase d'infection massive ; la réplication de l'HBV est maximale. A cette étape, le bilan hépatique est normal, les mécanismes de l'immunité innée se mettent en place et préparent l'induction de l'immunité spécifique.
- une phase de réaction immunologique : elle fait intervenir à la fois les mécanismes de l'immunité innée et ceux de l'immunité spécifique : sécrétion d'interféron alpha/beta ; synthèse de protéines antivirales, de molécules du complexe majeur

d'histocompatibilité ; activation des cellules présentatrices d'antigène, des lymphocytes T de type CD4, des cellules Natural Killer et de lymphocytes T cytotoxiques ; synthèse de cytokines inflammatoires. Cette réaction immunologique va entraîner la destruction des hépatocytes infectés présentant à leur surface les antigènes de capsid virale. Selon son intensité et sa durée, les conséquences cliniques sont variables, avec un risque d'hépatite fulminante dans le cas où plus de 90% des hépatocytes sont détruits.

- une phase finale de résolution et de régénération des hépatocytes.

Les manifestations cliniques de l'infection aiguë par l'HBV sont très variées. L'infection est infra-clinique dans la majorité des cas quand la contamination a lieu dans la petite enfance. Toutefois, 30 à 50% des individus infectés à l'âge adulte vont présenter, 1 à 6 mois après la contamination, un tableau d'infection aiguë, caractérisée par une asthénie profonde, un ictère et une augmentation du taux de transaminases plasmatiques, reflets de la cytolysé hépatocytaire ([McMahon et al., 1985](#)). Cette cytolysé n'est pas causée directement par le virus, qui n'est pas cytopathogène, mais par la réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte. Environ 1% des patients symptomatiques développent une réponse immunitaire exacerbée, réalisant un tableau d'hépatite fulminante ou sub-fulminante (selon le délai entre l'apparition de l'encéphalopathie et le début de l'ictère), d'évolution souvent fatale (80%) en l'absence de transplantation hépatique en urgence. En France, l'HBV représente près de 70% des cas d'hépatite fulminante d'origine virale([Antona et al., 2007](#)).

Dans un deuxième temps, on peut assister à la résolution de l'infection, avec conversion sérologique (disparition de l'antigène HBs et apparition d'anticorps anti-HBs, 1 à 6 mois après l'ictère) et négativation de la charge virale. L'antigène HBe, qui était apparu peu avant l'ictère, disparaît très rapidement et des anticorps anti-HBe apparaissent. Cependant, Werle-

Lapostolle et coll. ont montré la persistance d'ADN proviral, sous forme d'ADN circulaire covalent clos (ADNccc), permettant une réactivation potentielle de l'infection, notamment en cas d'immunodépression ([Werle-Lapostolle et al., 2004](#)) ([Yeo and Johnson, 2006](#)) ([Hoofnagle, 2009](#)).

#### ***1.1.8.1.2 Infection chronique***

Le passage à l'infection chronique, définie par la persistance de l'AgHBs pendant plus de six mois après l'infection aiguë, concerne une proportion variable des individus infectés par l'HBV. L'âge est le principal facteur lié au passage à la chronicité : en cas d'infection à la naissance, chez un nouveau-né de mère porteuse de l'antigène HBs, qui n'a pas été sérovacciné, il est de près de 90%. En cas de contamination dans la petite enfance (avant 4 ans), il est d'environ 25% et d'environ 5% si la contamination a lieu chez l'adulte immunocompétent. En revanche, il est plus élevé en cas d'immunodépression ou d'infection d'une personne âgée de plus de 50 ans ([Chang, 2000](#); [Hézode, 2010](#)).

L'infection chronique peut être divisée en plusieurs phases, qui ne sont pas toujours successives :

- une phase de tolérance immunitaire, caractérisée par un antigène HBe positif, une charge virale HBV très élevée et des valeurs normales de transaminases. Les lésions histologiques sont absentes ou minimales. La progression de la fibrose étant inexistante, le risque de cirrhose et de CHC est quasi nul. Cependant, l'ADN de l'HBV est susceptible de s'intégrer dans le génome des hépatocytes, ce qui est associé à un risque potentiel de cancérogenèse indépendant de la cirrhose. La probabilité de perte spontanée de l'antigène HBs est très faible. Les patients sont très contagieux. Cette phase peut durer plus de 30 ans en cas de contamination à la naissance.

- une phase d'activité immunitaire. Le taux d'ADN-HBV est plus modéré, et les transaminases sont supérieures à la limite supérieure de la normale (mais peuvent fluctuer). Les lésions histologiques (activité nécrotico-inflammatoire, fibrose) se développent. Cette phase est liée à la mise en place d'une réponse immune, qui entraîne la lyse des hépatocytes infectés, le virus n'étant pas lui-même cytopathogène. L'incidence de la perte de l'antigène HBe à cette phase est de 10% par an environ (dépend du génotype, le génotype C reste HBe positif plus longtemps que le génotype B), elle peut être précédée d'une exacerbation des transaminases ([Livingston et al., 2007a](#)).

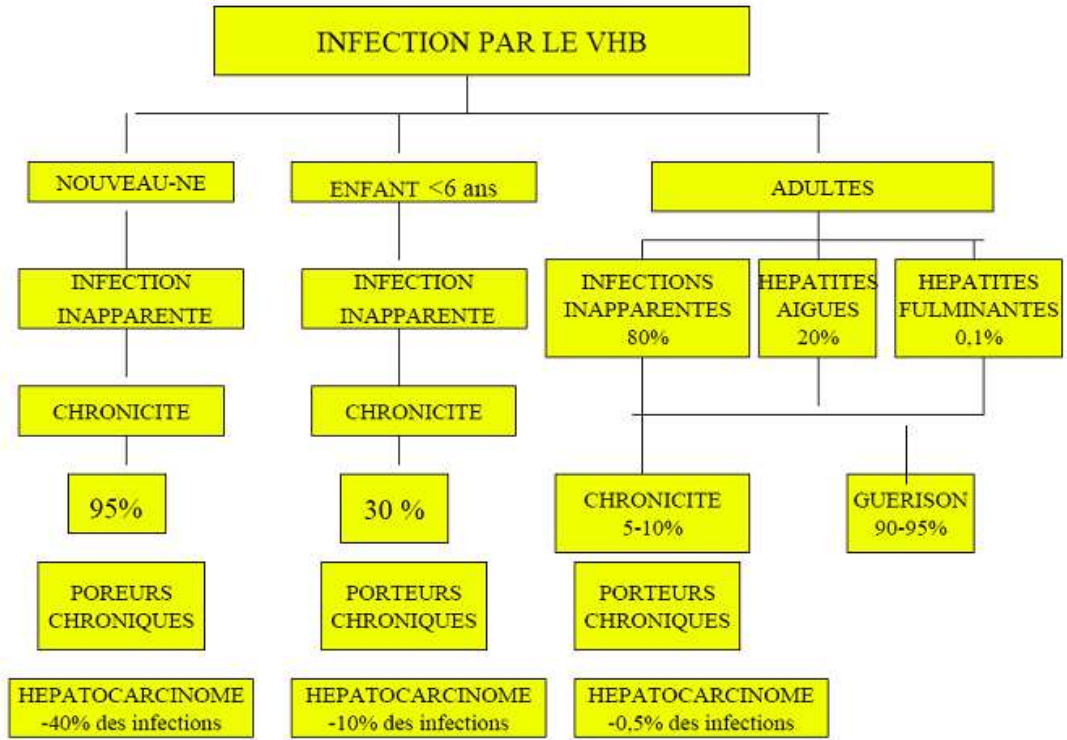
- une phase inactive (ou de portage inactif), caractérisée par un antigène HBe négatif/anticorps anti-HBe positif, une faible répllication de l'HBV (<2000 UI/mL), des transaminases normales et une activité faible. La maladie est contrôlée par la réponse immune, le risque de développer une cirrhose ou un CHC sont très faibles. La probabilité de clairance spontanée de l'antigène HBs (le traitement n'est pas recommandé à cette phase) est de 0.5 à 1% par an ([Chu and Liaw, 2007](#)).

- phase d'hépatite chronique HBe négatif; elle peut suivre la phase d'activité immunitaire, ou la phase inactive après réactivation (notamment lors d'une immunosuppression). La répllication virale et les transaminases sont fluctuantes. Le virus porte des mutations dans la région du BCP et/ou du Précore. Ces malades peuvent évoluer vers la cirrhose et le CHC.

L'infection B chronique peut donc se présenter sous deux formes cliniques : certains patients se révèlent être des porteurs asymptomatiques du virus, alors que d'autres présentent une hépatite chronique active, avec une répllication virale importante. Durant cette infection prolongée, des lésions histologiques s'accumulent et peuvent aboutir à une cirrhose (incidence



de 2 à 10% par an, risque de 20-40% après 10-30 ans), avec risque de décompensation hépatique, et à un carcinome hépatocellulaire (risque évalué à 3-5% par an dans les zones de faible endémie). Ces complications sont responsables de la morbidité et mortalité associée à l'infection par l'HBV. L'incidence de la cirrhose est plus élevée chez les patients HBe négatifs que positifs (8-10% versus 2-6%) ([Hadziyannis and Vassilopoulos, 2001](#)) ([Liaw et al., 1988](#)). Le risque de CHC est de 0,1%/an chez les porteurs inactifs, de 1%/an en l'absence de cirrhose, et de 2-8%/an en présence de cirrhose (en Asie) ([Fattovich et al., 2008](#)) ([Yim and Lok, 2006](#)). D'autres facteurs, démographiques (sexe masculin, âge avancé, antécédent familial), environnementaux (alcool (RRx6), aflatoxine), viraux (génotype, ADN>2000 UI/mL chez les patients >40ans, co-infection HCV, HIV (RRx4) ou HDV, mutation core) et probablement génétiques, influencent également le développement de la maladie hépatique ([Neuveut et al., 2010](#)).



**Figure 9** : Histoire naturelle de l'infection par l'HBV.

### 1.1.8.2 Cancérogène liée au virus de l'hépatite B

L'infection par l'HBV est une cause majeure de maladie chronique du foie. Il existe une forte association entre infection chronique HBV et développement de cirrhose et de CHC. Plus de 50% des cas mondiaux de CHC sont liés à une infection par l'HBV ([Parkin et al., 2001](#)).

La plupart des CHC liés au HBV se présentent comme l'évolution à long terme d'une cirrhose active ou inactive. Cependant, certaines tumeurs (10 à 40% selon les régions) se développent sur des lésions histologiques mineures ([Kremsdorf et al., 2006](#)). Le développement d'un CHC est un processus multifactoriel faisant intervenir, outre l'HBV, des facteurs de l'hôte (facteurs génétiques, ....) et environnementaux (alimentation, ....). Par exemple, l'ingestion d'aflatoxine B1 aggrave le risque de CHC chez l'individu infecté par l'HBV, et réciproquement ([Wild and Montesano, 2009](#)).

Le rôle de l'HBV et de ses protéines dans le processus de cancérogène est complexe et fait appel à des mécanismes directs et indirects. Au moins deux mécanismes ont été proposés dans la cancérogène HBV : l'intégration du génome de l'HBV dans le génome de l'hôte provoquant une instabilité chromosomique et des phénomènes de mutagenèse insertionnelle ([Buendia, 2000](#)); et l'activation par les protéines virales, de l'expression de gènes cellulaires impliqués dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaires. En effet, des propriétés transactivatrices ont été attribuées à la protéine HBx et aux protéines d'enveloppe ([Neuveut et al., 2010](#)).

Des séquences de génome HBV intégrées dans l'ADN cellulaire ont été observées dans des lignées d'hépatocarcinome, et dans 80% des CHC associés au HBV chez les patients ([Brechot et al., 1980](#)). Elles peuvent concerner l'ensemble du génome HBV, mais la région contenant le gène HBX est presque systématiquement intégrée ([Paterlini et al., 1995](#)) ([Murakami et al.,](#)

2005) ([Feitelson and Lee, 2007](#)). Des séquences nucléotidiques des gènes codant des protéines d'enveloppe tronquées PréS1/S2 ont aussi été retrouvées dans des tumeurs.

En plus des phénomènes d'intégration du gène HBX dans le génome cellulaire, de nombreux travaux ont montré l'implication de la protéine HBx dans les processus de cancérogenèse liés au HBV.

HBx est une petite protéine multifonctionnelle de 154 aa (17 kDa) ayant des propriétés transactivatrices et agissant par des interactions protéine - protéine. Elle interfère avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire, et active notamment de nombreuses protéines kinases, des cytokines, des facteurs de croissance et des facteurs de transcription divers : NF- $\kappa$ B, STAT-3, AP-1, CREB, le facteur nucléaire des cellules T activées (NF-AT), .... Elle joue un rôle déterminant dans la survie cellulaire et l'initiation de la transformation de l'hépatocyte ([Diao et al., 2001](#)).

L'expression de HBx augmente au cours du développement de la cirrhose et des tumeurs hépatiques ([Moriarty et al., 1985](#)) ([Wang et al., 1991](#)) ([Paterlini et al., 1995](#)). 80 à 90% des patients ayant une cirrhose ou une tumeur HBV sont positifs pour HBx dans le foie et 70% ont également des anticorps anti-HBx dans le sérum ([Wang et al., 1991](#)) ([Hwang et al., 2003](#)). D'autres études, en revanche, n'ont pas mis en évidence la protéine HBx dans les cellules tumorales des patients ayant un CHC ([Henkler et al., 1995](#)).

### **1.1.8.3 Corrélation entre génotype et clinique**

De nombreuses études semblent montrer l'existence d'un lien entre les génotypes d'une part et la sévérité de l'atteinte du foie et la réponse aux traitements d'autre part ([Kay and Zoulim, 2007](#)). Cependant, les résultats sont assez difficiles à généraliser du fait de la répartition géographique distincte, à la fois des génotypes et des sous génotypes et que seuls 2 ou 3 génotypes ou sous génotypes HBV circulent à la fois dans un pays donné.

En Europe, où les génotypes HBV/A et HBV/D prédominent, le génotype HBV/A a été retrouvé de façon prédominante chez les patients atteints d'hépatite chronique active, alors que le génotype HBV/D était plus souvent associé à une hépatite aiguë ([Mayerat et al., 1999](#)). En Asie, beaucoup d'études ont comparé les génotypes HBV/B et HBV/C : ce dernier a été associé à une hépatite chronique plus grave, et une progression plus rapide vers la cirrhose et le cancer du foie ([Chan et al., 2003](#)) ([Sumi et al., 2003](#)). Cependant, il semble que cette différence s'atténue avec l'âge.

Plusieurs études menées dans le bassin amazonien ont montré que le génotype HBV/F était associé à une évolution sévère, et à la survenue d'une hépatite fulminante ([Casey et al., 1996](#)) ([Quintero et al., 2001](#)). Mais ces patients étaient en même temps co-infectés par l'HDV de génotype 3. Une étude en Alaska a confirmé une association importante entre le génotype HBV/F et l'apparition d'un CHC ([Livingston et al., 2007b](#)), et une autre étude, espagnole, a retrouvé une plus grande fréquence de mortalité chez des patients infectés des souches HBV/F (par comparaison aux patients infectés par les génotypes HBV/A et HBV/D) ([Sanchez-Tapias et al., 2002](#)).

En revanche, pour certains auteurs, il n'existerait aucun lien entre les génotypes et la sévérité hépatique. Une étude faite en Ouzbékistan n'a démontré aucune différence au niveau de la sévérité histologique entre le génotype D et le génotype A ([Kato et al., 2002b](#)). Une autre étude plus récente chez des patients indiens (des porteurs asymptomatiques, des patients atteints d'hépatite aiguë ou chronique, des patients atteints de cirrhose ou de carcinome hépatocellulaire) confirme l'absence de lien entre génotype A ou D et sévérité de la maladie hépatique ou réponse aux traitements ([Madan et al., 2009](#)). Une étude publiée en 2004, a trouvé une différence dans les manifestations cliniques entre les sous- génotypes A1 et A2 ([Tanaka et al., 2004](#)).

Enfin, les génotypes interviennent dans la réponse au traitement par interféron, visualisée notamment par la séroconversion dans le système HBe : des études ont observé une meilleure réponse pour l'HBV/A versus HBV/D ([Erhardt et al., 2005](#)) ([Zhang et al., 1996a](#)), et pour HBV/B versus HBV/C ([Wai et al., 2002](#)). Cette différence pourrait être liée, au moins en partie, au fait qu'on retrouve plus de mutants Pré C-C parmi les souches HBV/C, et que ceux-ci répondent moins bien au traitement que les souches sauvages ([Kao et al., 2000](#)).

Donc pour l'instant, il n'y a pas encore de données permettant formellement de lier la sévérité de la maladie hépatique et la réponse aux traitements antiviraux en fonction du génotype des souches infectantes. Des analyses plus précises, considérant l'hétérogénéité intra-génotypique, pourraient expliquer les différences observées ([Akuta and Kumada, 2005](#)). De plus, il faut probablement aussi tenir compte d'autres paramètres pouvant influencer l'évolution de la maladie hépatique : facteurs génétiques, alcoolisme, co-infection avec l'HCV, l'HDV ou le HIV, facteurs environnementaux, accès aux soins. L'accumulation des données demeure nécessaire dans ce domaine, en intégrant la détermination des sous génotypes, même si la limite majeure de telles études est le fait qu'un nombre limité de génotypes différents circulent à la fois sur un même territoire. De plus des études multicentriques paraissent aussi difficiles à mener, du fait de la concentration des patients dans des pays en voie de développement, cumulant d'autres problèmes de santé publique.

## 1.2 Le virus de l'hépatite D

### 1.2.1 Introduction

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 (HBV) ([Rizzetto et al., 1977](#)). Cet antigène, dont la présence était toujours associée à l'infection par l'HBV, n'était jamais retrouvé dans les biopsies hépatiques de patients non infectés par HBV. De plus, cet antigène ainsi que les anticorps correspondants n'étaient détectés que chez certains porteurs chroniques de l'HBV.

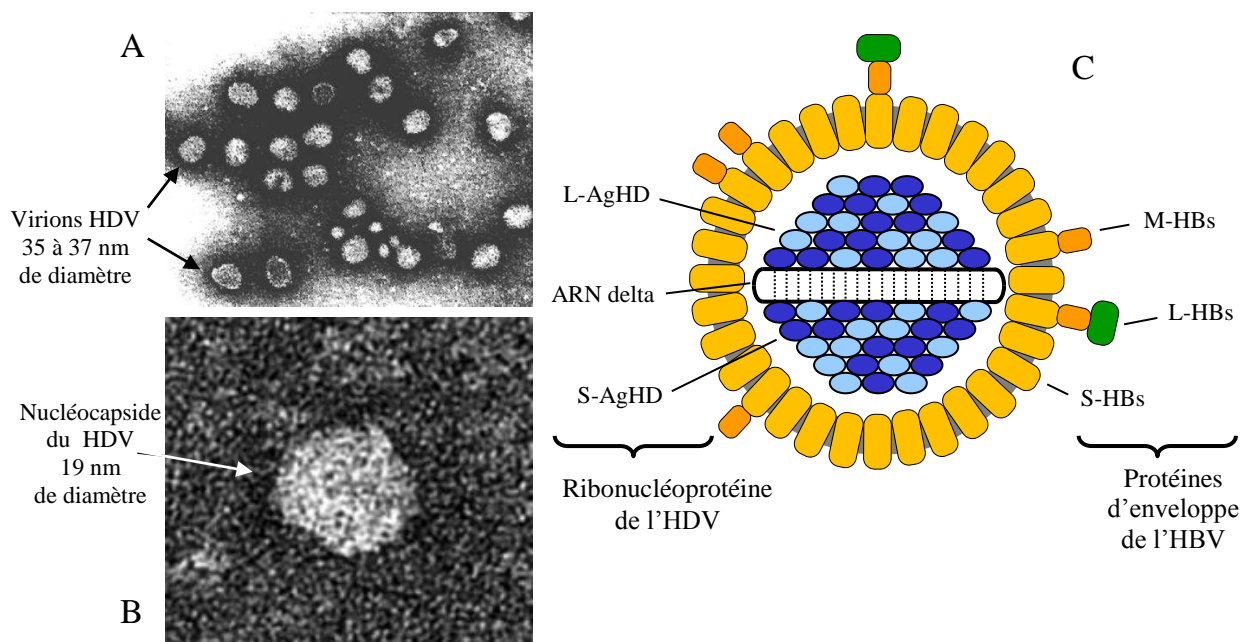
Cet antigène fut appelé « antigène delta » et fut initialement considéré comme un antigène supplémentaire de HBV. Ce n'est qu'en 1980 que des transmissions expérimentales au chimpanzé ont confirmé qu'il s'agissait d'un nouvel agent transmissible et pathogène nécessitant une co-infection avec l'HBV pour sa réplication. ([Rizzetto et al., 1980](#)). Le développement d'un test de détection des anticorps anti-delta permit de mettre en évidence la forte prévalence de l'infection au sein des populations hémophiles ou utilisatrices de drogues par voie intraveineuse. Par la suite, diverses études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence des régions d'endémie au Sud-Est de l'Italie et au sein des populations indigènes du Venezuela ([Hadler et al., 1984](#)), de la Colombie ([Ljunggren et al., 1985](#)), du Brésil ([da Fonseca and Simonetti, 1987](#)) et du Pérou ([Sjogren and Colichon, 1991](#)). Parallèlement, des études de microscopie électronique couplées à des approches de biologie moléculaire ont permis d'identifier dès le début des années 80, une petite particule virale comportant l'antigène delta et un ARN d'environ 1700 nucléotides, l'ensemble étant enveloppé dans une membrane contenant les antigènes de surface de HBV (AgHBs) ([Rizzetto et al., 1980](#)).

L'ensemble de ces résultats a permis de définir un nouveau genre viral ne comportant qu'un seul représentant : le genre Deltavirus ([Rizzetto, 1983](#)). Le séquençage complet du génome en 1986 permit de préciser sa ressemblance avec des agents pathogènes de plantes, en particulier les viroïdes et virusoïdes, mettant en évidence le caractère unique de ce virus au sein de la classe des virus animaux. La réplication de l'HDV est complètement indépendante de celle de l'HBV. Pour le moment, on ne connaît que peu d'éléments sur l'origine de l'HDV ainsi que sur la période de son association avec l'HBV.

La particule virale HDV 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 10). La ribonucléoprotéine de l'HDV 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'HDV contre 4 / 1 / 1 pour l'HBV ([Rizzetto et al., 1980](#)) ([Lai, 1995b](#)).

Avec un génome d'environ 1700 nucléotides, l'HDV est le plus petit virus connu capable d'infecter l'Homme. Il est à noter qu'il existe des similitudes entre l'ARN HDV et l'ARN de certains agents infectant les plantes, notamment les viroïdes. En effet, l'HDV et les viroïdes ont une structure simple brin d'ARN circulaire et fermé en forme de bâtonnet. De même, l'ARN HDV et les viroïdes contiennent des séquences d'ARN possédant une activité catalytique appelée les ribozymes. Enfin, ni l'HDV ni les viroïdes ne sont capables d'encoder leurs propres polymérases. Cependant, il existe une différence majeure entre les viroïdes et l'HDV : l'HDV possède une phase de lecture ouverte qui code p24 et p27. (figure 10)





(Wang et al.; 1986 - Ryu et al.; 1993)

**Figure 10 : La particule virale HDV.**(A) Photographie en microscopie électronique (G x 70 500) des particules virales HDV de 35 à 37 nm de diamètre. (B) Photographie en microscopie électronique (G x 1 000 000) de la nucléocapside de l'HDV de 19 nm après traitement par NP-40 et dithiothréitol. (C) Représentation schématique de la particule virale HDV. Sa structure chimérique est composée d'une ribonucléoprotéine formée de l'ARN delta associé aux deux protéines HD (p24 et p27) et d'une enveloppe contenant les protéines L-HBs, M-HBs et S-HBs de HBV dans un ratio de 1/5/95

## 1.2.2 Épidémiologie

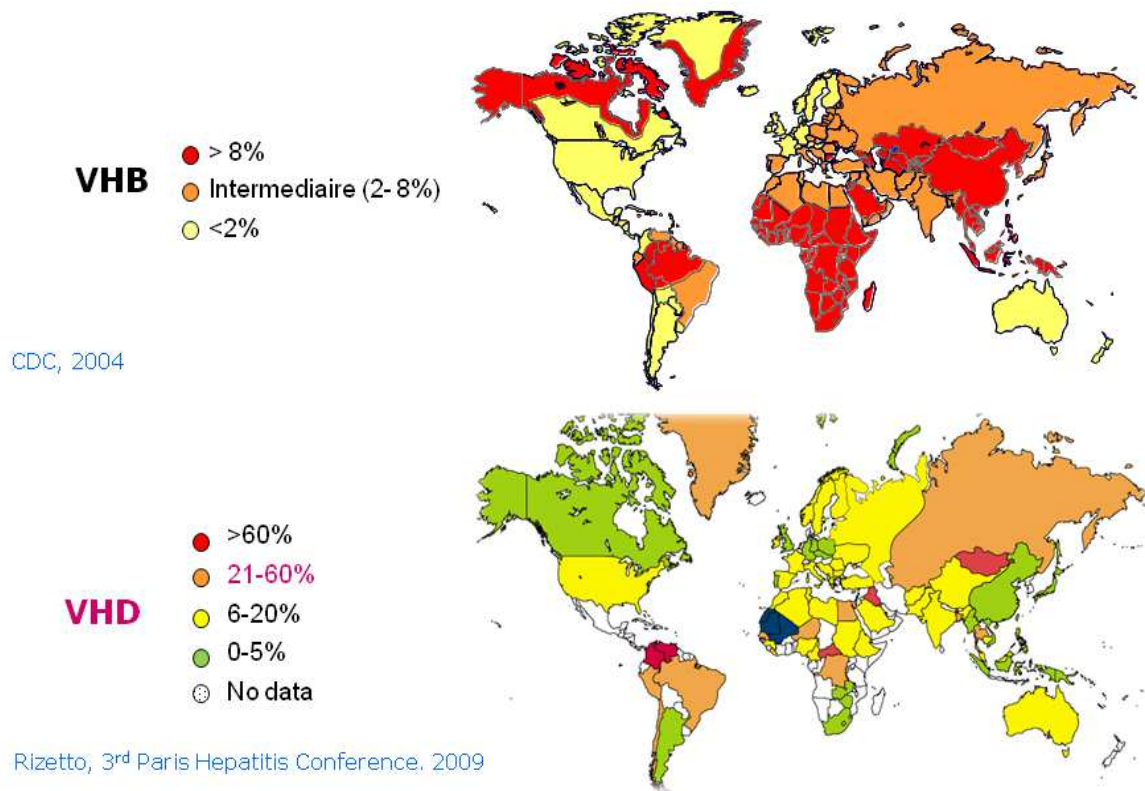
L'homme est le réservoir naturel de l'HDV, mais ce dernier est capable d'infecter d'autres primates comme le chimpanzé ([Rizzetto et al., 1980](#)) ([Sureau et al., 1989](#)), ainsi que des non primates comme la marmotte américaine (*Marmota monax*). Dans ce dernier cas, il utilise comme virus auxiliaire le virus de l'hépatite de la marmotte WHV ([Negro et al., 1989](#)). L'épidémiologie de l'infection par l'HDV est imparfaitement établie, car peu de véritables études ont été effectuées récemment dans le monde, en particulier dans les zones endémiques pour l'HBV, 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 l'HDV pourrait être de 5% à 20%. Soit, sur 400 millions de porteurs chroniques de l'HBV, environ 10-20 millions de porteurs de l'HDV ([Radjef et al., 2004](#)).

Comme l'HDV ne peut se développer qu'en présence d'une infection simultanée ou le plus souvent antérieure par l'HBV, 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 (figure 11). En particulier, alors qu'il existe des régions pour lesquelles la forte prévalence de l'HBV est associée à une forte prévalence de l'HDV (Afrique et Amérique du Sud), d'autres régions du globe, dans lesquelles HBV est prévalent semblent moins touchées par HDV (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'HDV. En effet, on peut penser que l'infection par l'HBV à la naissance ou la petite enfance défavoriserait l'infection par l'HDV, ce qui expliquerait le faible taux de l'HDV observé dans certains pays ou régions de très fortes endémies pour l'HBV, comme la Chine ou l'Asie du Sud-Est.

L'autre hypothèse serait une résistance génétiquement confirmée de certaines catégories de population qui expliquerait cette faible prévalence de l'HDV en dépit d'une très forte

prévalence de l'HBV. Enfin, une autre hypothèse encore plus simple pourrait être aussi l'absence d'études systématiques réalisées dans diverses régions du monde où cette infection est encore peu prise en compte. Par ailleurs, alors que dans les pays industrialisés, la transmission virale se fait majoritairement par voie sexuelle ou parentérale (surtout chez les utilisateurs de drogues par voie intraveineuse) ([Bialek et al., 2005](#)) ([Mele et al., 2007](#)), dans les pays en voie de développement, elle semble plus être le fait de passages intra familial au cours de la petite enfance que d'une contamination néo-natale ([Mehmet et al., 2005](#)) ([Niro et al., 1999](#)). Les diverses études de séroprévalence de l'hépatite delta révèlent une distribution mondiale non uniforme du virus, bien que certaines régions du globe restent peu documentées. Les régions à forte endémie sont représentées par le Moyen Orient ([Mumtaz et al., 2005](#)) l'Asie Centrale ([Oyunsuren et al., 2006](#)) ([Zaki et al., 2003](#)), l'Afrique de l'Est et Subsaharienne ([Aceti et al., 1991](#)) ([Cenac et al., 1995](#)) ([Crovari et al., 1991](#)) ([Ojo et al., 1998](#)) ([Roingard et al., 1992](#)) ([Saudy et al., 2003](#)) ([Skalsky et al., 1996](#)), le bassin amazonien, les régions de Samara et de Yakoutie en Russie ([Abe et al., 2004](#)), certains pays d'Europe centrale comme la Roumanie ([Par et al., 1992](#)) et enfin certaines îles du Pacifique Sud (Nauru) ([Chao et al., 1990](#)). De même, il a été décrit une forte séroprévalence delta dans une région restreinte du Groenland ([McMahon, 2004](#)). Actuellement, alors que la prévalence de l'infection a diminué autour du bassin méditerranéen, surtout en Italie ([Mele et al., 2007](#)), elle reste élevée en Europe de l'Est, en Grèce et en Turquie ([Erhardt et al., 2006](#)) ([Gaeta et al., 2000](#)) ([Uzunlimoglu et al., 2001](#)). Dans ces pays, la séroprévalence chez les porteurs chroniques de l'AgHBs dépasse 20%, et elle peut atteindre 60% dans certains pays comme la Mongolie ([Inoue et al., 2005](#)) ([Oyunsuren et al., 2006](#)) ou les régions amazoniennes du Brésil ([Viana et al., 2005](#)). L'inégalité de répartition peut également s'observer dans un même pays. Par exemple au Kenya, le taux de prévalence de l'HDV est <1% dans le Sud tandis qu'il est de 31% chez les porteurs chroniques asymptomatiques dans le Nord.

La transmission de l'HDV survient, comme pour l'HBV, par voie sexuelle, sanguine ou lors d'une infection de personne à personne par voie horizontale. Cette transmission peut se produire soit par le biais d'une infection simultanée par l'HBV (co-infection) soit par l'infection d'une personne déjà porteuse du virus de l'hépatite B (surinfection). La transmission materno-foetale doit certainement exister, mais elle serait beaucoup moins efficace que dans le cadre de l'HBV. Qu'il s'agisse d'une co-infection ou d'une surinfection, l'HDV est responsable des complications plus graves qu'en cas d'infection isolée par l'HBV. Parmi ces complications, on cite une incidence 10 à 100 fois plus élevée de développer une hépatite aiguë fulminante souvent mortelle. De même le passage à la chronicité et un risque accru de développer un cancer du foie semblent être observés ([Fattovich et al., 2000](#)) ([Fattovich et al., 2004](#)). Les infections concomitantes HBV/ HDV sont responsables du taux de mortalité le plus élevé (20%) de toutes les hépatites virales.



**Figure 11: Séroprévalence de l'infection B-delta.**(en haut): Répartition géographique de la séroprévalence de l'AgHBs de HBV. (en bas): Répartition géographique de la séroprévalence des anticorps anti-HDV chez les porteurs chronique de l'AgHBs.

### 1.2.3 Génome, antigénome et ARN messagers de l'HDV

La ribonucléoprotéine (RNP) est composée d'un ARN génomique circulaire simple brin d'environ 1700 bases de polarité négative et des 2 protéines p24 et p27. Durant la réplication, on trouve dans les cellules 3 types d'ARN : l'ARN génomique, l'ARN antigénomique, un intermédiaire de réplication de l'HDV (les 2 formes font environ 1700 nucléotides) et l'ARN messager codant l'antigène delta d'environ 800 nucléotides (Figure 12).

Génome et antigénome ont une structure circulaire pseudo double brin liée à la présence de 70% de bases G et C entraînant un auto appariement intra moléculaire([Kos et al., 1986](#)) ([Wang et al., 1986](#)). Ceci expliquerait pourquoi l'HDV est capable d'utiliser l'ARN polymérase ADN dépendant de la cellule hôte pour la transcription de son génome.

Dans la cellule infectée, les 3 formes d'ARN, génome, antigénome et l'ARNm sont retrouvées dans les proportions respectives suivantes: 300.000 ; 50.000 et 600 copies. D'autres types d'ARN sont produits lors de la réplication de l'HDV. Il s'agit de multimères d'ARN génomique ou antigénomique, résultant du mécanisme de réplication en cercle roulant. Puis grâce à l'activité ribozyme d'autoclivage et d'auto-ligation les molécules d'ARN monomériques de génome ou d'antigénome sont produites.

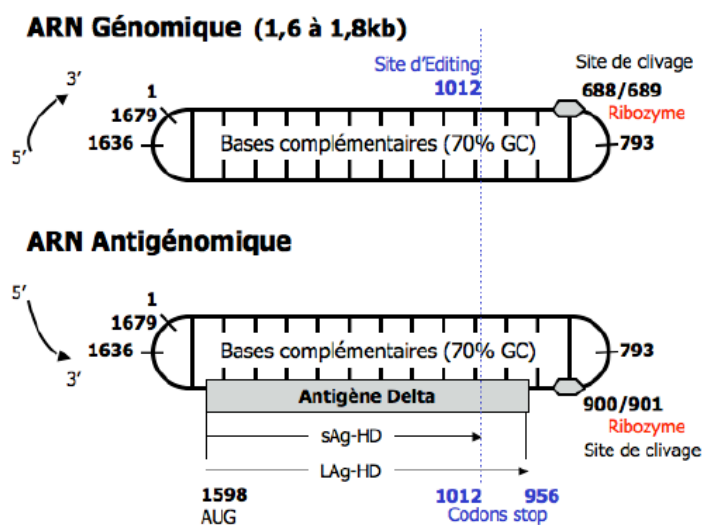


Figure 12 : Représentation de génome HDV

## 1.2.4 Cycle viral

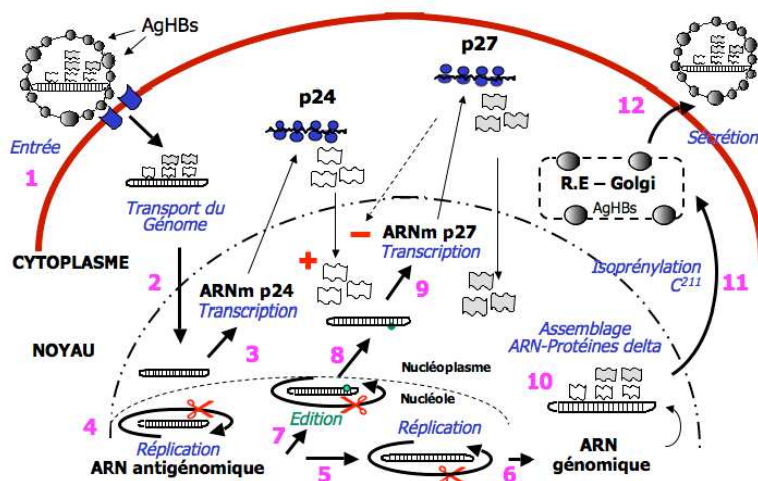
Comme pour l'HBV, le mécanisme d'entrée de l'HDV dans les hépatocytes demeure encore inconnu. Mais, partageant les mêmes protéines d'enveloppe, on peut supposer que cette entrée se fait probablement par une interaction entre la grande protéine L de l'AgHBs et le (s) récepteur (s) cellulaire (s) à identifier ([Sureau et al., 1992](#)).

Le génome se réplique par un mécanisme en cercle roulant, d'où la production d'un intermédiaire de réplication de la taille du génome nommé l'ARN antigénomique. Bien qu'il existe entre 5 et 10 cadres de lecture potentiels, c'est uniquement sur cet ARN antigénomique que se trouve le seul cadre de lecture ouvert permettant de coder l'antigène delta ([Lai, 1995b](#)). Cet antigénome peut aussi être soumis à un mécanisme « d'édition » qui modifie le codon stop de l'ARN messager en position 1012 en codon tryptophane et entraîne un allongement du cadre de lecture jusqu'au codon stop suivant en position 956 et qui va coder la grande protéine delta. Ces deux ARN, génomique et antigénomique possèdent des séquences

ribozyme (90 nucléotides très conservés entre les souches virales) leur conférant des activités d'autoclivage et d'autoligation, indispensables à la réplication de l'HDV. (figure 13)

La production des particules delta est très importante et peut atteindre, à la phase aiguë, jusqu'à 10<sup>12</sup> virions/ml ([Lai, 1995a](#)) ([Ganem, 2001](#)). La réplication de l'HDV est très efficace, et plus importante que celle du virus auxiliaire. On retrouve une particule HDV pour 1 000 particules vides contre plus de 100 000 pour une particule de Dane. D'autre part, le plus souvent, la réplication de l'HDV se traduit par une inhibition de la réplication du virus HBV auxiliaire. V. Williams au sein du laboratoire de virologie de CHU d'Avicenne a élucidé en partie les mécanismes de cette inhibition ([Williams et al., 2009](#)). Récemment, Le Gal et al. , ont montré que des répliquons HBV et HDV élevés peuvent exister chez des patients turcs ([Le Gal et al., 2012](#)).





**Figure 13 : Cycle de réplication de l'HDV.**

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.

### 1.2.5 Les protéines virales

Les ARN messagers codant les protéines du virus delta ont une taille d'environ 800 nt. Ils sont pour partie coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. Ils codent les deux isoformes de la protéine delta ([Lazinski and Taylor, 1993](#)). Ces deux protéines produites à partir du même cadre de lecture d'une seule matrice sont identiques pour 195 acides aminés et ne diffèrent que par la présence de 19 acides aminés (aa) supplémentaires, à l'extrémité C du LHDAg.

En effet, il existe un mécanisme post transcriptionnel appelé « editing » (ou édition) des ARN dont le substrat est l'ARN antigénomique qui permet la transformation du codon stop UAG en position 1012 en codon UGG (tryptophane). Ce mécanisme d'édition est catalysé par les enzymes cellulaires ADAR-1 et ADAR-2 (Adénosine Déaminase agissant sur les ARNs double brin). Cette transformation entraîne un allongement de la phase de lecture et la synthèse des 19 acides aminés supplémentaires en C-terminal de la grande protéine delta ([Jayan and Casey, 2002](#)) ([Wong and Lazinski, 2002](#)).

Bien qu'ayant 90% d'homologie de séquence, ces deux protéines jouent des rôles différents au cours de l'infection virale. La protéine sHDAg produite dans les premiers stades de l'infection est indispensable à la réplication virale. La protéine LHDAg, en revanche, est produite plus tardivement et favorise l'assemblage de la particule virale tout en inhibant la réplication virale.

Les 2 protéines delta présentent dans leur structure de nombreux domaines fonctionnels. De la partie N-terminale, vers la partie C terminale, on distingue tout d'abord un domaine torsadé de type « crémaillère à leucines » (aa 13 à 60) qui forme une hélice alpha par la répétition d'une leucine tous les 7 acides aminés (L,X6,L,X6,L,X6,L). Ce domaine est responsable des interactions protéine-protéine permettant la formation d'homo- ou d'hétérodimère (p24-p27) ([Wang et al., 1994](#)) ([Xia and Lai, 1992](#)).

Entre les aa 69 et 88 se trouve un domaine de localisation nucléaire « NLS » qui permet l'acheminement de la ribonucléoprotéine vers le noyau pour la réplication. C'est plus précisément la séquence PPAKKLR (« core » du NLS) riche en acides aminés basiques qui rend possible la localisation nucléaire des protéines delta, mise en évidence par immunofluorescence à partir de protéines recombinantes ([Xia et al., 1992](#)).

Le troisième domaine fonctionnel est un domaine de fixation aux ARN (aa 97 à 146). Ce domaine est composé de deux motifs riches en arginine (« ARM ») (aa 97 à 107 et 136 à 146) espacés par un motif « Hélice-Boucle-Hélice », très important pour la fonction d'activation de la réplication de la protéine sHDAg ([Lee et al., 1993](#)). Enfin, il n'a pas été décrit de rôle fonctionnel au domaine situé entre les aa 147 et 195. Au sein des 19 aa propres à p27 se trouve un domaine impliqué dans l'activité d'assemblage des particules virales delta. Cette activité est due à la présence d'un résidu isoprénylé sur la cystéine en position 211. Ce résidu, également appelé groupement farnésyl, se fixe sur le motif CXXQ considéré comme substrat pour la prénylation ([Glenn et al., 1992](#)). La séquence CXXQ est totalement conservée quel que soit le génotype.

La prénylation, qui modifie la conformation native de la protéine p27, permet sa migration vers la membrane du réticulum endoplasmique et son interaction avec l'AgHBs de l'HBV, favorisant l'assemblage des particules virales delta ([Hwang and Lai, 1993](#)). Les 19 aa supplémentaires de p27 posséderaient également un signal d'export nucléaire (NES) permettant de faire sortir la ribonucléoprotéine du noyau ([Lee et al., 2001](#)).

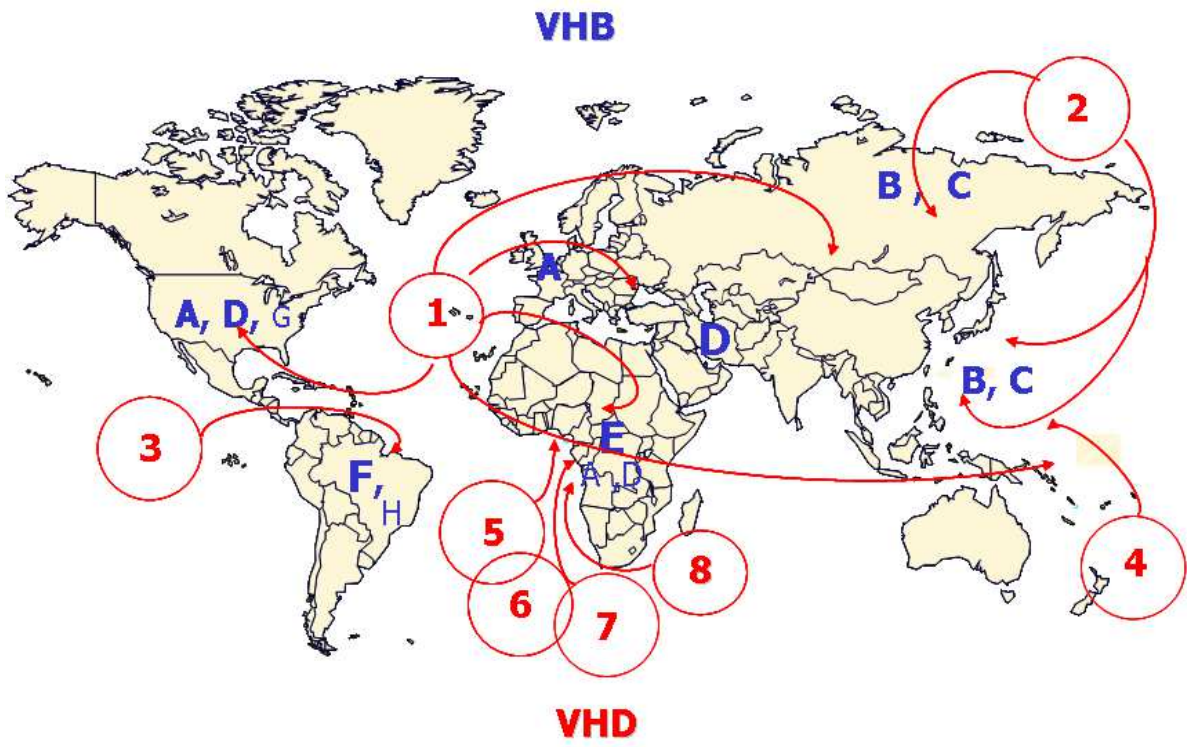
### **1.2.6 Bases moléculaires de la variabilité génétique :**

Comme la plupart des virus à ARN, l'HDV présente une grande variété génétique. Les mutations sont entre autres favorisées par les polymérase cellulaires et les ADAR

(Adénosine Déaminase des ARNs doubles brins) qui peuvent reconnaître d'autres régions du génome et de l'antigénome en dehors du site d'édition en position 1012 ([Chang et al., 2005](#)), .

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 ([Rizzetto et al., 1980](#)). Plus tard, des études ont permis de préciser la distribution géographique du virus et ont conduit à une classification virale en 3 génotypes : I, II et III ([Casey et al., 1993](#)). En 1995, J.C. Wu et al ont proposé de diviser le génotype II en IIa et IIb ([Wu et al., 1995b](#)).

A l'hôpital Avicenne, le laboratoire de virologie associé au centre national de référence des hépatites B, C et Delta, dirigé par Paul Dény puis par Emmanuel Gordien, travaille depuis plus 15 ans sur l'HDV. Le département de Seine-Saint-Denis comporte une proportion importante de patients originaires d'Afrique sub-Saharienne porteurs de l'AgHBs et infectés par l'HDV. Le séquençage nucléotidique de régions partielles (région R0) ([Ivaniushina et al., 2001](#)) ou du génome complet des isolats de ces patients ainsi que des études phylogénétiques approfondies incluant des séquences décrites dans la littérature, ont permis de distinguer 4 nouveaux génotypes viraux, de reclasser les génotypes IIa et IIb en HDV-2 et HDV-4, et de porter à 8 (HDV-1 à HDV-8) le nombre de génotypes constituant le genre Deltavirus ([Radjef et al., 2004](#)) ([Le Gal et al., 2006](#)) (Figure 14 ).



**Figure 14 :** Epidémiologie moléculaire de l'HDV dans le monde

## 1.2.7 Génotypes HDV

### 1.2.7.1 Définition

La classification en génotypes repose sur une divergence dans la séquence nucléotidique complète supérieure à 20% entre 2 génotypes ou supérieur à 15% si on considère la région R0 ([Ivaniushina et al., 2001](#)). Comme pour l'HBV, on distingue des sous génotypes au sein des différents génotypes HDV. Ceux-ci sont définis par une divergence dans la séquence nucléotidique complète de plus de 10% (E. Gordien, communication orale, EASL 2010 et manuscrit en préparation). Comme pour l'HBV, génotypes et sous génotypes HDV sont aussi caractérisés par une distribution géographique précise.

### 1.2.7.2 Génotypes HDV

*(figure 15)*

#### 1.2.7.2.1 HDV-1

Le génotype I est ubiquitaire. Il est présent en Europe, en Amérique du Nord, en Afrique et en Asie. L'HDV-1 est le plus souvent associé au génotype HBV/D dans la région méditerranéenne ([Bozdayi et al., 2004](#)) ([Saudy et al., 2003](#)) et en Russie. Cependant le génotype 1 peut s'associer aux autres génotypes du virus de l'hépatite B, notamment les génotypes A, B ou C ([Kao et al., 2002](#)). Frédéric Le Gal, au sein du laboratoire d'Avicenne, a remarqué une variabilité intra génotypique de l'ordre de 15,1%. Les valeurs les plus élevées étaient retrouvées entre les souches africaines et les souches non africaines. À partir de séquences complètes de ces 39 souches de génotype HDV-1, une divergence dans la séquence complète de plus de 10% permettait de distinguer au moins 3 « sous-groupes » correspondant aux sous génotypes HDV-1 (E. Gordien, conférence monothématique HDV, EASL, Istanbul 2010, et manuscrit en préparation).

#### **1.2.7.2.2 HDV-2; HDV-4**

Les génotypes II et IV sont restreints au Japon, Taiwan et à la Yakoutie (Sibérie) et sont associés aux génotypes HBV/B et HBV/C ([Kao et al., 2002](#)) ([Moriyama et al., 2003](#)). Ils présentent, avec le génotype HDV-1 des taux de divergence dans la séquence nucléotidique complète respectivement de l'ordre de 25,6% et 26,5%.

#### **1.2.7.2.3 HDV-3**

Le génotype III, le plus divergent, semble être cantonné au nord de l'Amérique du Sud, tout comme le génotype F d'HBV ([Nakano et al., 2001](#)). HDV-3 présente un degré de divergence de l'ordre de 34,5% avec le génotype HDV-1 et est, phylogénétiquement, le plus éloigné des autres génotypes delta. Il est essentiellement associé au génotype HBV/F.

Pendant longtemps, on a pensé que l'HDV-3 ne s'associait qu'au génotype F de l'HBV. Mais, des études récentes dans l'Est du bassin amazonien montrent que l'HDV-3 peut également s'associer aux autres génotypes de l'HBV, en l'occurrence les génotypes HBV/A et HBV/D ([Gomes-Gouvea et al., 2008](#)) ([Gomes-Gouvea et al., 2009](#)).

#### **1.2.7.2.4 HDV-5, HDV-6, HDV-7 et HDV-8**

Les génotypes 5, 6, 7, et 8 n'ont à ce jour été décrits que chez des patients Africains provenant de la région Subsaharienne. Ces génotypes sont le plus souvent associés aux génotypes HBV/E et HBV/A1 majoritaires dans cette région du monde. Les taux de divergence dans la séquence complète des HDV-5, -6, -7 et -8, avec l'HDV-1 sont respectivement de l'ordre de 27,9%; 28%; 28,6% ; et 27,4%.

Le génotype 8 de l'HDV a été initialement isolé et caractérisé en France à partir de trois patients issus de trois pays ouest-africain différents: Congo, Sénégal, et Côte-d'Ivoire. ([Le](#)

[Gal et al., 2006](#)) . Récemment, l'HDV-8 a été identifié dans les populations rurales et urbaines du Gabon ([Makuwa et al., 2008](#)) ([Makuwa et al., 2009](#)).

De façon intéressante, HDV-8 a été détecté au Brésil chez deux patients qui sont nés et ont toujours vécu au Brésil, qui n'étaient jamais allés en Afrique et n'avaient eu aucun contact avec les gens de ce continent ([Barros et al., 2011](#)). Ces souches HDV-8 pourraient très probablement avoir été introduites, comme l'HBV/A1 au Brésil, au cours de la traite négrière qui a duré du 16<sup>ème</sup> au 19<sup>ème</sup> siècle (Voyages : TheTrans-Atlantic Slave TradeDatabase [www.slavevoyages.org](http://www.slavevoyages.org)). La présence de l'HDV-8 au Brésil pourrait refléter la relation étroite avec la distribution géographique des HDV génotypes et les migrations humaines.

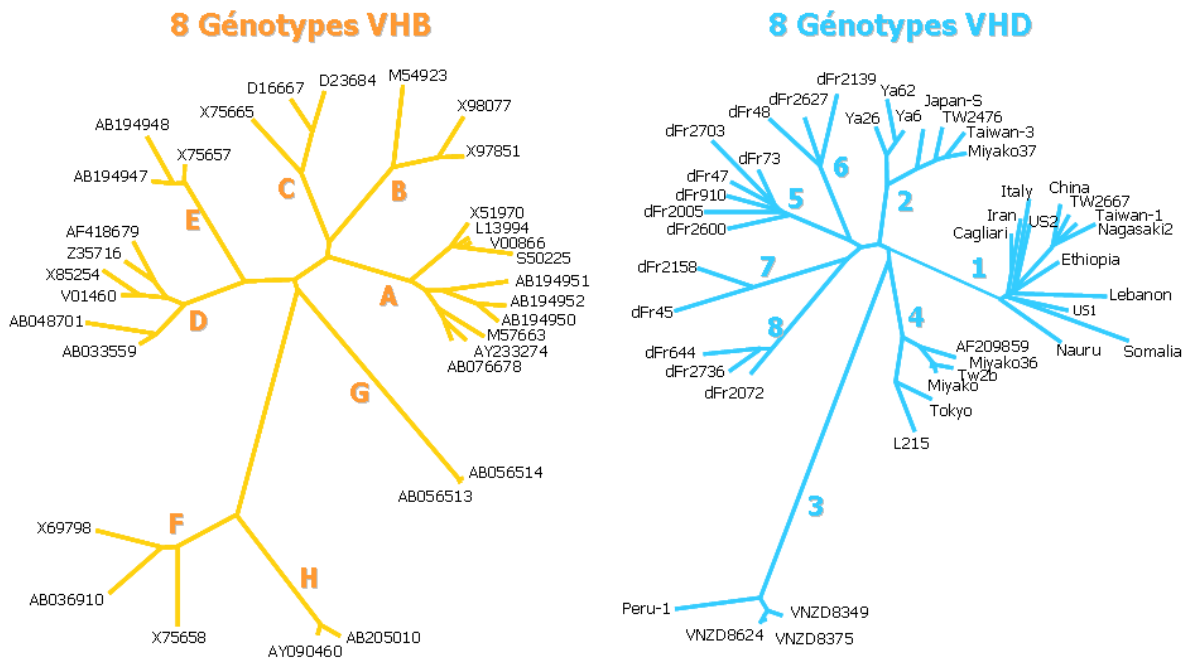
### **1.2.7.3 Recombinaison génotypique**

Au cours du temps, ces mutations génèrent des variants qui enrichissent la diversité génétique et conduisent à l'individualisation de clades viraux. D'autres facteurs comme les recombinaisons génétiques au cours d'infections mixtes peuvent également favoriser la diversité génétique. En 1999, 5 infections mixtes impliquant les virus HDV-2 et HDV-4 ont été décrits parmi les prostituées tandis que 2 autres infections mixtes impliquant les virus HDV-1 et HDV-2 ont été décrits parmi un groupe contrôle de 11 patients ([Wu et al., 1999](#)).

Les « quasi-espèces » virales apparaissent au cours des infections chroniques et sont liées à l'accumulation de mutations ponctuelles au cours des cycles réplicatifs. La présence de populations HDV hétérogènes à un temps donné chez un patient chroniquement infecté a été initialement observée par Wang et al. en 1986 ([Wang et al., 1986](#)), avec parmi les mutations observées, un taux de transitions (U/C) ou (A/G) très important (94%). L'activité de l'ADAR-1 en dehors du site d'édition pourrait expliquer la fréquence importante d'apparition de ce type de mutations ([Casey, 2006](#)). Un taux de mutations de  $1,2 \times 10^{-3}$



substitution/nucléotide/an a été calculé dans la région codante du génome par Imazeki et al en 1990 ([Imazeki et al., 1990](#)). Cependant lorsque d'autres régions plus variables, du génome viral sont prises en compte, ce taux passe à  $1 \times 10^{-2}$  substitution/nucléotide/an et comporte des délétions ou insertions d'un ou plusieurs nucléotides ([Casey, 2006](#)) ([Chao et al., 1994](#)) ([Lee et al., 1992](#)). Les mutations ponctuelles observées au niveau du génome HDV ne sont pas la seule cause de la diversité génétique du virus, et les recombinaisons génétiques ont probablement accentué son évolution génétique.



**Figure 15 : Diversité génétique de HBV et son virus associé HDV.**(à gauche) Représentation radiale d'un arbre phylogénétique mettant en évidence les 8 génotypes HBV (A à H).(à droite) Représentation radiale d'un arbre phylogénétique mettant en évidence les 8 génotypes HDV (1 à 8).

## 1.2.8 Impact de la co-infection B-Delta sur la sévérité de la maladie hépatique

### 1.2.8.1 Histoire naturelle de l'infection HDV (figure16)

D'une façon générale, l'infection mixte B-Delta conduit à des hépatopathies plus sévères que l'infection par HBV seul ([Smedile et al., 1994](#)). Dans l'histoire naturelle, on distingue deux types d'infection mixte HBV et HDV :

- rarement (environ 2% des cas), il s'agit d'une co-infection simultanée HBV/HDV : elle est à l'origine d'une hépatite aiguë. Le patient présente un risque accru d'hépatite fulminante (2 à 10%). La résolution de l'infection survient dans 60 à 80% des cas, par disparition de la répllication des deux virus. L'évolution vers la chronicité est observée dans 10 à 30% des cas selon les études et les pays concernés([Casey et al., 1993](#)) ([Farci, 2003](#)) ([Flodgren et al., 2000](#)).
- le plus souvent, il s'agit d'une surinfection, par l'HDV, d'un sujet déjà porteur de l'HBV : la multiplication de l'HDV est massive, et une hépatite aiguë delta symptomatique se développe chez 50 à 70% des patients. Le risque d'hépatite fulminante est alors très élevé (jusqu'à 15 à 20% des cas), et l'infection passe à la chronicité dans 90 à 95% des cas.

De nombreuses études cliniques ont rapporté que les patients infectés de façon chronique par l'HDV et l'HBV souffraient d'une maladie hépatique plus sévère que les patients infectés par l'HBV seul, avec une progression plus rapide vers la cirrhose ([Rizzetto, 2009](#)). En effet, environ 70% des patients présente une cirrhose dans un délai de 10 ans suivant l'infection, la survenue d'un carcinome hépatocellulaire étant observée à 15 ans dans 45% des cas([Fattovich et al., 2004](#)) ([Gu et al., 2001](#)). De plus, le taux de mortalité est multiplié par deux, et la

survenue de l'hépatocarcinome multipliée par trois chez les patients au stade clinique de cirrhose ([Wu et al., 1995a](#)) ([Fattovich et al., 2000](#)) ([Fattovich et al., 2004](#)) ([Niro et al., 2010](#)). Toutefois, des formes cliniques peu sévères, voire asymptomatiques, peuvent également être observées ([Wu et al., 1995b](#)) ([Wu et al., 1994](#)).

Les facteurs à l'origine de cette diversité du pouvoir pathogène sont probablement multiples, à la fois d'ordre virologique (les éventuels facteurs de virulence de HBV et de HDV restent à être identifiés) et immunitaire. Certains auteurs ont évoqué la possibilité d'une différence de pouvoir pathogène selon le génotype viral Delta

Parallèlement aux facteurs viraux de virulence, des facteurs individuels dans la réponse immunitaire à l'infection sont sans doute à l'origine de la diversité des tableaux cliniques observés. La réponse spécifique CD4+ et CD8+ ne semble pas être directement responsable du caractère inflammatoire de l'infection ([Nisini et al., 1997](#)), bien que des infiltrats lymphocytaires T CD8+ aient été retrouvés autour des hépatocytes infectés. Par contre, diverses réactions auto-immunes ont été décrites au cours des hépatites chroniques B-Delta. En particulier, l'existence d'anticorps anti-LKM-3 (« liver kindey microsomal membranes ») dirigés contre l'uridine diphosphate glucuronosyl transférase ([Philipp et al., 1994](#)) et anti-BCLA (« basal cell layer of rat forestomach ») a été mise en évidence ([Zauli et al., 1984](#)).

La réponse immunitaire humorale à l'infection par HDV fait intervenir plusieurs domaines immunogènes des protéines HD ([Bergmann et al., 1989](#)).

Un effet cytopatogène direct de l'HDV a également été décrit que ce soit par l'intermédiaire de son ARN ou de l'AgHD ([Farci, 2003](#)) ([Gowans and Bonino, 1993](#)). Il a été montré in vitro que l'activité ribozyme pouvait bloquer en trans l'expression de certains gènes cellulaires. La séquence ribozyme pourrait, par ailleurs, inhiber la formation d'un complexe faisant intervenir l'ARN cellulaire 7SL par complémentarité des séquences sur une région d'environ 50 nucléotides ([Negro et al., 1989](#)).

Enfin, le pouvoir pathogène des protéines LHD et sHD pourrait être lié à leur capacité de fixation aux ARN et à certaines protéines cellulaires. En particulier, un rôle direct de sHD dans l'effet cytotoxique a été mis en évidence en culture. Ce rôle n'a pas été retrouvé pour LHD. Le rôle du virus « helper » HBV doit également être pris en compte. En effet, Roingeard et collaborateurs ont montré l'effet cytotoxique direct de l'AgHBc particulièrement marqué lorsqu'une répllication virale B et D était associée ([Roingeard et al., 1990](#)). Par ailleurs, le rôle de la protéine X de HBV dans la régulation de gènes cellulaires peut aussi être mis en cause dans la pathogenèse de l'infection B-Delta.

Parmi les facteurs influençant l'évolution de la maladie, la répllication de l'HDV, ou sa charge virale plasmatique, a souvent été le seul facteur indépendant retrouvé significativement associé à la sévérité de l'évolution de la maladie ([Romeo et al., 2009](#)).

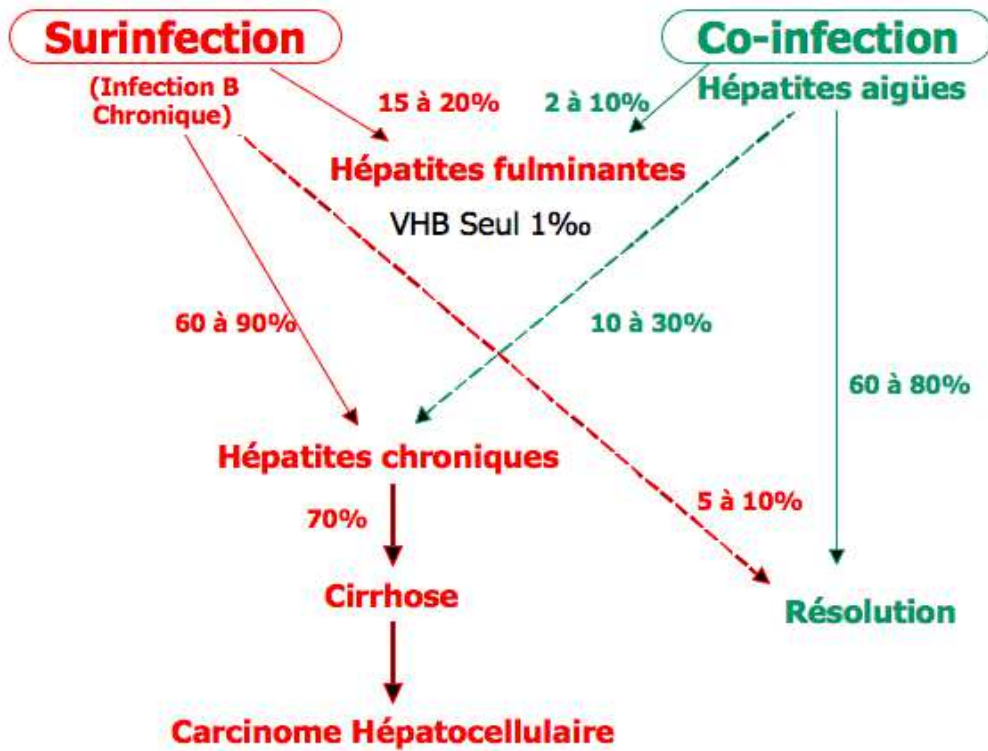


Figure 16 : Histoire naturelle de l'infection HDV

### 1.2.8.2 Génotypes et pathogénèse

Plusieurs auteurs ont rapporté une association entre la sévérité de l'infection HDV et génotype du virus infectant. Ainsi, les pathologies causées par les génotypes HDV-2 et HDV-4 seraient moins sévères que celles qui sont causées par le génotype HDV-1 (241). Le génotype HDV-1 a été retrouvé dans des maladies hépatiques de modérées à sévères. Ce large spectre serait peut-être lié à la très grande diversité (différents « sous groupes ») observée au sein de l'HDV-1. Ainsi des cas d'hépatites fulminantes ont été décrites en Suède, en Russie et en Taiwan ([Zhang et al., 1996b](#)) ; alors qu'en Mongolie ou aux îles de Rhodes en Grèce, ce sont surtout des pathologies modérées qui ont été observés ([Inoue et al., 2005](#)). Quant au génotype HDV-3, il serait responsable des pathologies les plus graves, notamment les hépatites fulminantes ([Casey et al., 1993](#)).

Concernant les génotypes HDV-5, HDV-6, HDV-7 et HDV-8, il est à noter que ceux ont été isolés chez des patients ayant une hépatite chronique delta active. Certains étaient cirrhotiques ou en attente de transplantation.

Cependant toutes ces conclusions concernant génotypes HDV et sévérité de la maladie, reposent sur peu d'études et avec un faible nombre de patients.

Quoiqu'il en soit, le pouvoir pathogène de l'HDV repose sur des mécanismes multiples et complexes faisant probablement intervenir l'efficacité du mécanisme « d'édition » de l'ARN viral, nécessaire à la synthèse de la grande protéine Delta et à l'assemblage des virions Delta. La relation entre génotype HDV et pouvoir pathogène est donc nécessairement à mettre en rapport avec le génotype HBV, bien que la réplication de ce dernier soit en général inhibée par l'infection delta ([Williams et al., 2009](#)).

## **1.3 Prise en charge des patients infectés par l'HBV et/ou l'HDV**

### **1.3.1 Prise en charge des patients infectés par l'HBV**

#### **1.3.1.1 Diagnostic biologique**

Le diagnostic de l'infection HBV repose sur la détection de marqueurs viraux spécifiques directs ou indirects dans le foie ou le sérum des patients (figure 17):

- l'AgHBs signe la présence de particules virales
- l'AgHBe est un marqueur de réplication du virus sauvage
- On peut également mettre en évidence le génome du virus. En routine, les techniques basées sur le principe de la PCR en temps réel sont actuellement utilisées. De plus, une harmonisation des résultats est maintenant possible grâce à l'étalonnage des différentes techniques par un étalon international, les résultats devant maintenant être exprimés en unités internationales par millilitre (UI/mL ou mieux en log UI/mL).

La charge virale HBV permet d'évaluer et de suivre les patients sous traitement antiviral. La recherche de l'ADN HBV est également utile pour diagnostiquer une infection HBV dans des cas spécifiques (dépistage des dons de sang pendant la fenêtre sérologique, infection occulte, profils sérologiques atypiques, mutants d'enveloppe).

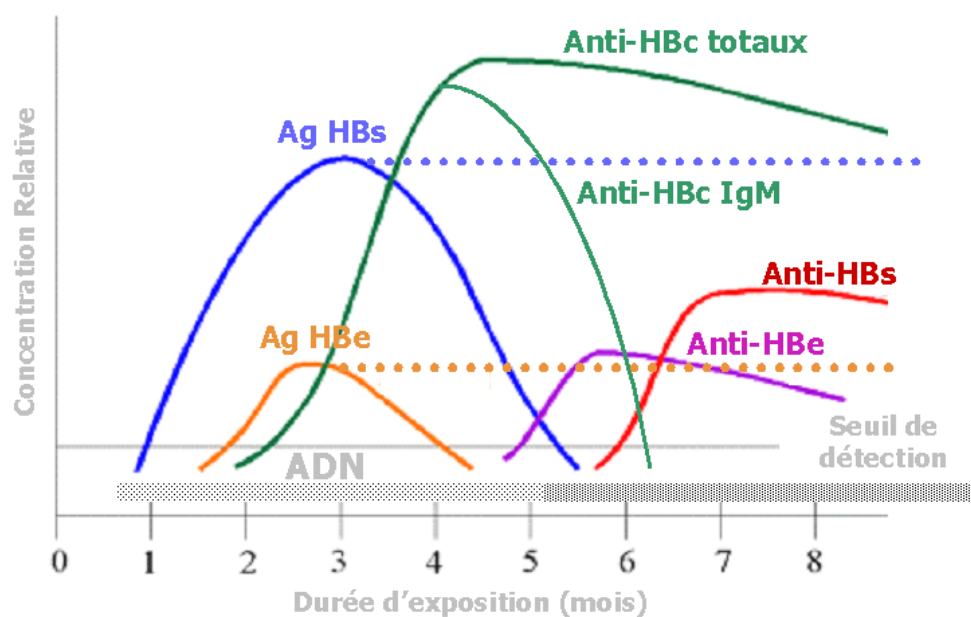
Le diagnostic indirect repose sur la mise en évidence de la réponse anticorps spécifique dirigée contre les antigènes viraux :

- Les Ac anti-HBc totaux, retrouvés à tous les stades cliniques de l'infection, sont le marqueur le plus fidèle. La recherche spécifique des Ac anti-HBc de type IgM permet d'identifier une infection récente, soit lors d'une primo-infection soit lors des réactivations aiguës d'une hépatite chronique.
- L'apparition des Ac anti-HBe constitue le premier verrou immunologique de l'organisme contre la réplication du virus sauvage. Cependant, cette pression



immunitaire, bloquant le virus sauvage, peut favoriser et sélectionner au cours de l'évolution des mutants, appelés mutants Pré C. Ceux-ci sont caractérisés par des mutations sur le gène Pré C, entraînant l'incapacité pour ces souches de fabriquer l'AgHBe.

- Les Ac anti-HBs constituent le marqueur de protection ou de résolution d'une infection. Le taux de ces Ac anti-HBs (exprimé en UI/L ou en mUI/mL) permet alors d'estimer la protection d'un individu après une vaccination ou une infection résolutive. Cependant, dans le cadre d'une infection résolue depuis de nombreuses années, et en l'absence de nouveau contact avec le virus, ce taux sérique peut diminuer voire disparaître.



**Figure 17 :** Cinétique d'évolution des différents marqueurs biologiques de l'infection par l'HBV.

Traits pleins : hépatite aiguë résolutive. Traits pointillés : évolution vers la chronicité.

### 1.3.1.2 Traitement

Le traitement de l'infection chronique par l'HBV reposait auparavant sur l'utilisation de l'interféron alpha (IFN- $\alpha$ ) standard, en injection sous-cutanée à raison de 3 à 6 millions d'unités trois fois par semaine, utilisé pendant 6 mois à un an en monothérapie. Ce traitement s'est avéré efficace de façon prolongée chez 20 à 40% des patients ([Wong et al., 1993](#)). Son utilisation est toutefois responsable de l'apparition de nombreux effets indésirables pouvant conduire à l'arrêt prématuré du traitement. Sa pharmacocinétique a été grandement améliorée grâce à la pégylation du composé actif, permettant une injection hebdomadaire unique. Le traitement par IFN- $\alpha$  est d'autant plus efficace que les patients ont été sélectionnés avant mise sous traitement : âge jeune, AgHBe positif, transaminases élevées, charge virale HBV modérée, génotype A ou B ([EASL, 2009](#)) .

L'existence de nombreux patients non-répondeurs à l'IFN- $\alpha$ , ainsi que la fréquence d'effets indésirables significatifs, ont stimulé la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques, qui a bénéficié des connaissances sur l'infection par le virus de l'immunodéficience acquise (HIV).

Ainsi les analogues nucléosidiques et nucléotidiques sont aujourd'hui les traitements de choix, entraînant l'inhibition de la réplication virale du génome par la polymérase virale. Leurs profils de tolérance sont excellents, et la cinétique de réponse est plus rapide que lors d'un traitement par l'IFN- $\alpha$ .

La lamivudine (analogue de cytidine), une molécule également employée dans le traitement de l'infection par le HIV, a été la première utilisée. Après 1 an de traitement, le taux de séroconversion HBe est de 20% environ. La majorité des patients a une réponse virologique (négativité de l'ADN de l'HBV), une diminution de l'activité histologique et de la fibrose. Cependant, son utilisation prolongée s'accompagne de la sélection de mutants d'échappement dans le site YMDD de la polymérase. Ces mutations de résistance sont mises

en évidence chez 20% des patients après un an de traitement, et chez 70% d'entre eux après 4 ans de traitement ([Lai et al., 2003](#)). Ce traitement ne doit plus être utilisé seul et en première intention du fait de la fréquence de ces mutations.

L'adéfovir (analogue nucléotidique de l'adénine), est efficace même chez les mutants YMDD résistants à la lamivudine. Cependant, la sélection de mutants de résistance apparaît après plusieurs années de traitement (0% à 1 an, 3% à 2 ans, et 29% à 5 ans) ([Hadziyannis et al., 2006](#)).

Depuis quelques années, deux analogues de deuxième génération ont été mis sur le marché : l'entécavir (analogue de guanosine) et le ténofovir (analogue nucléotidique proche de l'adéfovir). Ces molécules, utilisées en première ligne, sont très efficaces et n'induisent pas ou peu de résistance ([Guzelbulut et al., 2012](#)).

L'objectif des traitements est tout d'abord une négativation de la charge virale plasmatique, une séroconversion dans le système HBe, puis la disparition de l'AgHBs et l'apparition d'anticorps anti-HBs signant la résolution de l'infection.

Cependant, même si certaines études semblent montrer une diminution de l'ADNccc au cours de certains traitements ([Werle-Lapostolle et al., 2004](#)), aucun schéma thérapeutique actuel ne permettrait de débarrasser totalement l'organisme de cet ADN proviral.

La transplantation hépatique est la seule alternative thérapeutique chez les patients ayant une maladie hépatique terminale, dans les cas d'hépatite fulminante, de cirrhose grave décompensée ou de carcinome hépatocellulaire. Cependant, en dépit des protocoles de prévention (antiviraux, immunosuppresseurs) le risque de récurrence sur le greffon à partir de réservoir secondaire existe ([Roche et al., 2003](#)).

### **1.3.1.3 Prévention**

La vaccination contre l'HBV a la particularité de protéger non seulement contre une infection par l'HBV, mais aussi, en conséquence, sur une éventuelle infection par l'HDV. Il

n'existe cependant aucun vaccin spécifique anti-HDV, pour les patients déjà porteurs de l'AgHBs.

Plusieurs types de vaccins sont disponibles, conférant tous une immunité dirigée contre les protéines d'enveloppe du virus. Depuis 1989, les vaccins obtenus par génie génétique chez la levure ou dans des cellules eucaryotes CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois) ont remplacé les protéines vaccinales purifiées obtenues chez les patients infectés. Le dosage du taux d'anticorps anti-HBs permet d'évaluer l'efficacité de la vaccination. Un taux supérieur à 10 mUI/mL d'anticorps anti-HBs est considéré par l'OMS comme protecteur.

### **1.3.2 Prise en charge des patients infectés par l'HDV**

#### **1.3.2.1 Diagnostic biologique**

Le diagnostic virologique de l'hépatite delta repose à la fois sur des tests indirects (recherche d'anticorps anti-HD) et sur des tests directs (recherche de l'Ag-HD mais surtout de l'ARN viral) :

- *Les tests indirects* : Deux types d'Ac anti-HD peuvent être mis en évidence aux moyens de tests ELISA commerciaux : les Ac « totaux » (IgG et IgM) dont la détection repose sur un test de compétition, et les Ac de type IgM spécifiques anti-HD, dont la détection repose sur le principe de l'immuno-capture. La détection des Ac totaux permet le dépistage de l'infection par HDV chez les patients AgHBs positifs. La détection des IgM reflète la réplication virale ([Roingeard et al., 1992](#)) ([Farci et al., 1986](#)) et peut permettre de suivre l'évolution de la maladie lors de la phase chronique. Toutefois ce test manque de sensibilité en particuliers chez les patients immunodéprimés ([Lecot et al., 1993](#)) et fait le plus souvent place à la détection de l'ARN viral comme marqueur de réplication virale. D'autre part, les IgM peuvent être

absents chez des patients africains notamment (E Gordien Données personnelles non publiées).

- *Les tests directs* : La recherche de l'Ag-HD dans le sérum, qui repose sur une technique de type ELISA, ne présente d'intérêt que lors de la toute première phase de l'infection, car il est très rapidement complexé aux Ac circulants, ce qui le rend très vite indétectable. Actuellement, cette recherche n'est plus pratiquée dans le cadre du suivi des patients, ayant été remplacé par la détection de l'ARN viral dans le sérum. Les techniques fastidieuses d'hybridation moléculaire in situ ont rapidement laissé la place dans les laboratoires à des techniques de réactions de polymérisation en chaîne (PCR) à partir du sérum pour une application de routine. Ces techniques d'amplification de l'ARN de l'HDV par PCR précédée par une réaction de transcription inverse (RT-PCR) sont encore des techniques dites « maison » et ainsi chaque laboratoire de diagnostic utilise son propre protocole technique. La nécessité de définir des amorces d'amplification dans des régions très conservées du génome viral est devenue primordiale devant la mise en évidence d'une très grande diversité génétique du génome de l'HDV ([Radjef et al., 2004](#)). Ces techniques qualitatives de biologie moléculaire ont l'avantage d'avoir une très bonne sensibilité estimée avec un seuil de détection compris entre 10 et 100 copies/ml ([Smedile et al., 1990](#)) ([Smedile et al., 2004](#)) ([Ivaniushina et al, 2001](#)).

Une technique de PCR quantitative a été mise au point afin de quantifier la charge virale plasmatique des souches HDV-1, -2 et -4 ([Yamashiro et al., 2004](#)). Cette quantification réalisée en système SyberGreen permet de mesurer des charges virales allant de 1 à  $10^6$  copies/ml. Dans d'autres études réalisées en 2004, des techniques très sensibles de détection des génomes de l'HDV et de HBV par microarrays ont également été mises au point sans possibilité de quantification ([Zhaohui et al., 2004](#)).

Au laboratoire de Virologie d'Avicenne, Le Gal et collaborateurs ont développé une technique de quantification de la virémie HDV par une approche de PCR en temps réel. Ce test permet de quantifier de manière équivalente le génome viral de l'ensemble des génotypes identifiés à ce jour. Cette technique utilise la technologie TaqMan™ (Société Applied Biosystems) définie par un couple d'amorces et une sonde TaqMan™ MGB spécifiques du génome étudié. La quantification est obtenue par l'inclusion d'une gamme étalon externe au cours de chaque manipulation ([Le Gal et al., 2005](#)).

Récemment des techniques commerciales ont été proposées (Roche, AJ Roboscreen, Diapro notamment), mais leur évaluation à grande échelle et en particulier pour les génotypes africains doit être entreprise, car des études initiales ont montré que celles-ci étaient prises en défaut (Equipe du Dr GORDIEN à Avicenne, EASL, 2011 ; manuscrit en préparation).

### **1.3.2.2 Traitement**

La prise en charge thérapeutique de l'infection par HDV reste complexe et peu satisfaisante. En particulier, le fait qu'HDV utilise le système enzymatique de la cellule hôte pour se répliquer, invalide l'utilisation d'inhibiteurs des polymérases virales. Les analogues nucléos(t)idiques anti-HBV actuellement disponibles ne diminuant pas ou trop peu cette production, ces traitements ont jusqu'à présent échoué à prouver leur efficacité dans le traitement de l'infection HDV ([Lau et al., 1999](#)). Cette inefficacité a été démontrée pour le famciclovir ([Yurdaydin et al., 2002](#)), la lamivudine ([Niro et al., 2005](#)) et l'adéfovir. En outre, la ribavirine seule ou en combinaison avec l'IFN n'a pas conduit à des diminutions importantes du taux d'ARN HDV ([Niro et al., 2006](#)).

Une dizaine d'essais randomisés pour le traitement de l'HDV ont été publiés, mais concernant un nombre peu élevé de patients (20 à 60/essai), et utilisant des doses différentes d'interféron (3 à 9 MU, 3 fois par semaine), pendant une durée variant de 3 à 24 mois ([Chien, 2008](#)). La réponse était variable et dépendait du schéma thérapeutique, les meilleures réponses étant associées aux plus fortes doses et durées de traitement ([Farci et al., 2004](#)). De plus, si une majorité de patients présentait une réponse virologique et biochimique (normalisation des transaminases) en fin de traitement, le taux de rechute après arrêt du traitement était décevant. Des résultats intéressants ont également été obtenus avec l'interféron pégylé. Dans une petite étude sur 14 patients traités pendant 12 mois par de l'interféon pégylé alpha 2b, Castelnau a obtenu respectivement 57% et 36% de réponse virologique et biochimique (en fin de traitement), et 43 et 57% de réponse virologique et biochimique soutenue ([Castelnau et al., 2006](#)), mais ces résultats n'ont pas été confirmés dans une autre étude menée avec la même molécule en Italie ([Niro et al., 2006](#)). Au final, seuls 25% des patients auraient une réponse virologique soutenue, c'est-à-dire une négativation prolongée de la réplication de l'HDV.

Chez ces patients, le traitement améliore l'histologie et les paramètres biochimiques, avec une amélioration globale de la survie des malades ([Farci et al., 2004](#)).

Nous avons rapporté un cas de résolution de l'infection HBV/HDV suite à une bi-thérapie analogue de nucléos(t)ide + interféron pour un patient originaire du Daguestan et suivi dans notre laboratoire ([Mansour et al., 2010](#)). Cependant, la plupart des essais ayant évalué l'intérêt d'une bithérapie versus une monothérapie par interféron n'ont pas montré d'efficacité supérieure dans le bras bithérapie. La façon de combiner au mieux ces deux thérapeutiques n'est pas encore connue ([Wolters et al., 2000](#)).

La ribavirine, un agent anti-viral essentiel dans le traitement du HCV, est capable d'inhiber la réplication de l'HDV en culture cellulaire. Mais, à part dans quelques cas isolés,

l'utilisation d'une bithérapie interféron + ribavirine n'a pas non plus démontré une efficacité à long terme supérieure à l'interféron seul ([Gozlan et al., 2009](#)) .

Une approche potentiellement intéressante serait de cibler l'activité farnésyltransférase, qui est nécessaire pour la formation des nouvelles particules virales. Malgré ces résultats encourageants *in vitro*, les inhibiteurs de prénylation sont en attente de développement clinique. Se pose également le problème d'une éventuelle toxicité ([Taylor, 2003](#)).

Des données préliminaires *in vitro* ont également montré que l'inhibiteur d'entrée Myrcludex B inhibe l'entrée des particules virales HDV([Engelke et al., 2006](#)) .

Enfin, la greffe peut représenter le seul recours pour les patients avec une maladie du foie grave, avec toutefois le risque de récurrence sur le greffon ([Farci, 2003](#)) .

### **1.3.2.3 Prévention**

La vaccination contre l'HBV a la particularité de protéger non seulement contre une infection par l'HBV, mais aussi, par l'HDV.

La marmotte (infectée par le WHV, et surinfectée par l'HDV) est un bon modèle pour tester d'éventuels vaccins anti-HDV. Différentes stratégies ont été étudiées : peptides synthétiques, protéines exprimées en système procaryote ou eucaryote, vaccin ADN, virus de la vaccine exprimant l'Ag delta. Aucun vaccin n'a permis d'empêcher la surinfection HDV, même si certains protocoles ont permis de moduler l'évolution clinique de l'infection ([Fiedler and Roggendorf, 2006](#)) . Les anticorps anti-HDV retrouvés dans le sérum des patients infectés ne sont *a priori* pas neutralisants.



## 1.4 Infection HBV / HDV dans la région du Sahara en Afrique

L'Afrique est le deuxième plus grand continent après l'Asie touché par l'infection HBV. Bien qu'il soit relativement peu peuplé (environ 800 millions de personnes, 12% de la population mondiale), le portage chronique de HBV en Afrique est très élevé, avoisinant parfois jusqu'à 30% dans certaines régions ([Mulders et al., 2004](#)).

### 1.4.1 Épidémiologie

Le taux de prévalence de l'HBV varie en fonction des régions (figure 18). Plusieurs études ont montré l'importance de la prévalence de l'AgHBs chez les donneurs de sang dans plusieurs régions de l'Afrique où l'hépatite B est endémique : 0,3 à 1,56 % au Maroc, 5 à 20 % au Nigeria ([Otegbayo et al., 2003](#)), 15 à 20 % au Sénégal ([Vray et al., 2006](#)), 9,5% en Tanzanie ([Matee et al., 2006](#)). Deux études, réalisées en Mauritanie, ont montré une prévalence de l'AgHBs de 16,8 % chez des enfants scolarisés, de 15,7 % chez les femmes enceintes et de 17 à 20 % chez les donneurs de sang ([Tognarelli et al., 1994](#)) ([Rui et al., 1998](#)). Ce taux très variable d'une région à l'autre implique d'autres facteurs, des facteurs socioéconomiques ou de santé publique, jouent probablement un rôle important dans la transmission de ce virus.

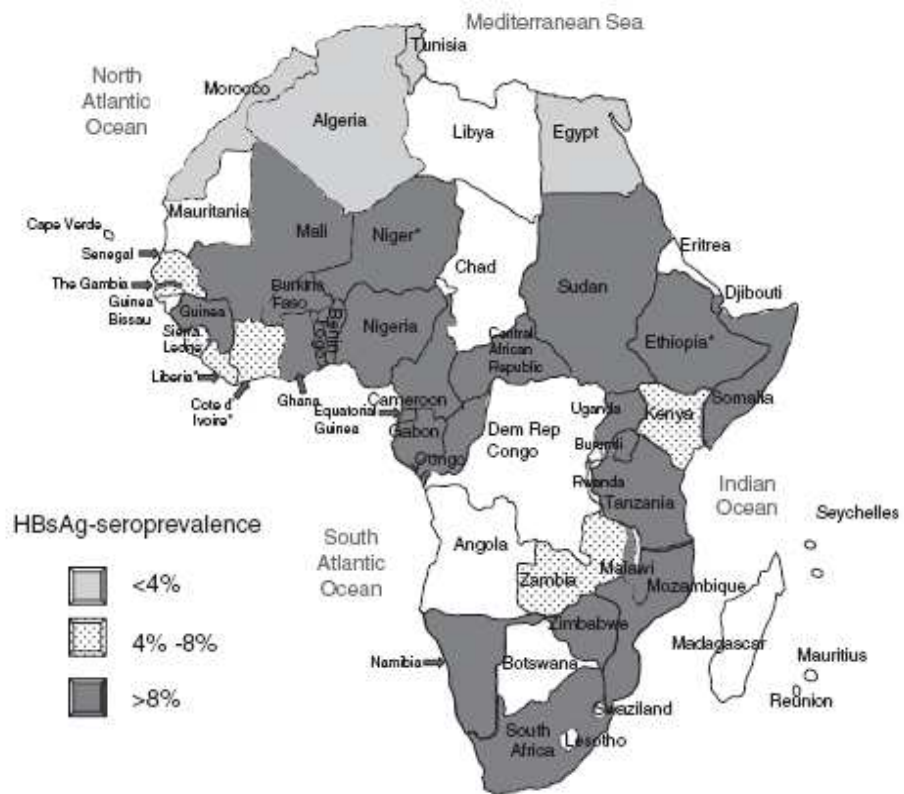
De plus, au sein d'une même région, il existe une certaine variabilité non seulement entre la population urbaine et la population rurale ([Amazigo and Chime, 1990](#)) ([Pellizzer et al., 1994](#)), mais également entre les sexes, la séroprévalence étant plus importante chez les hommes que chez les femmes ([Makuwa et al., 2009](#)) ([Kramvis and Kew, 2007](#)).

Dans les pays en voie de développement où l'endémie est très forte, la plupart des enfants sont généralement infectés à la naissance (transmission mère-enfant) ou pendant la petite enfance (jouet, circoncision, tatouage, scarification) ([Kew, 2002](#)).

D'autres facteurs peuvent contribuer à maintenir cette forte endémie, en l'occurrence les risques liés à des injections parentérales à des fins thérapeutiques ou à des fins de vaccination (les règles d'asepsie n'ayant toujours pas été respectées) mais aussi lors de rapports sexuels non protégés.

Cependant, les modes de transmission sont variables selon les pays en fonction notamment des politiques de sécurité transfusionnelle et des mesures générales de prévention. Si le Maghreb semble relativement peu touché, l'Afrique Subsaharienne paie un lourd tribut aux infections virales B et delta. Le risque du passage à la chronicité est d'autant plus élevé que le mode de transmission du virus se fait lors de la naissance ou pendant la petite enfance. Des mesures préventives volontaristes et énergiques pourraient permettre d'endiguer cette épidémie, dont surtout l'introduction du vaccin contre le virus de l'hépatite B, dans le programme élargi de vaccination (PEV) tel que recommandé par l'OMS depuis 1992. La mise en oeuvre de ces programmes de vaccination dans la plupart des pays de l'Asie de l'Est et du Sud-Est entre 1980 et 1990 a entraîné une réduction significative de la prévalence de l'infection dans ces pays ([Ruff et al., 1995](#)).

Contrairement à l'Asie de l'Est et du Sud-Est, la plupart des pays d'Afrique Subsaharienne, ont tardivement introduit le vaccin contre le virus de l'hépatite B dans le PEV à cause principalement de son coût financier. Par exemple, en Mauritanie, la vaccination contre le virus de l'hépatite B a été introduite dans le PEV en 2004, et au Niger seulement en septembre 2008. De plus, il existe de multiples disparités entre villes, villages et le désert.



**Figure 18** Prévalence de l'AgHBs en Afrique. ([Kramvis 2007](#))

## 1.4.2 Données moléculaires

### 1.4.2.1 Génotypes et sous génotypes HBV

Trois génotypes principaux sont retrouvés en Afrique : les génotypes A, D et E. D'une façon générale, le génotype E est majoritairement présent en Afrique de l'Ouest et du centre, selon un large croissant s'étendant du Sénégal à la Namibie, incluant la Côte d'Ivoire, le Ghana, le Nigeria, le Togo, le Bénin, le Mali, la République Démocratique du Congo (RDC) et la Centrafrique. Quoique prédominant, ce génotype E, décrit pour la première fois en 1992 par Norder et associés ([Norder et al., 1992](#)), présente une variabilité intra génotypique très faible, de l'ordre de 1,8% ([Andernach et al., 2009a](#)). Cette diversité, cependant serait plus grande dans la partie nord du croissant E (du Bénin au Cameroun) que dans la portion sud (de la RDC à la Namibie). Cette faible variabilité génétique globale au sein de ce groupe E indiquerait une émergence et une propagation récente de ces souches en Afrique et donc une faible histoire évolutive. Cette hypothèse est confortée par l'absence de ces souches dans les pays de migration africaine massive, notamment dans les Amériques suite à la traite négrière qui a eu lieu entre les 16<sup>ème</sup> et 19<sup>ème</sup> siècles ([Warren et al., 1999](#)).

La majorité des souches non E décrites en Afrique appartiennent au génotype A, et en particulier au sous génotype A1. Ces souches ont été décrites en Afrique du Sud et dans les pays la côte Est africaine jusqu'à la corne de l'Afrique au nord et au Rwanda à l'ouest.

En revanche, les souches HBV/A sont plus rares à l'Ouest, et appartiennent à différents sous génotypes : A3 (identifié initialement au Cameroun, puis en Gambie, au Gabon et au Nigéria) ; A4 (rapporté au Mali et en Gambie) et A5 (décrit au Nigéria) ([Kurbanov et al., 2005](#)) ([Olinger et al., 2006](#)) ([Hannoun et al., 2005](#)) ([Candotti et al., 2007](#)). Le sous-génotype A6 a été trouvé chez 3 patients belges originaires du Rwanda et Congo et le sous génotype A7 a été récemment décrit au Rwanda et à l'ouest du Cameroun ([Hubschen et al., 2011](#)).

Le sous génotype A2, hautement prévalent en Europe a été rarement décrit en Afrique. La diversité des souches A est plus importante en Afrique (4%) que dans le reste du monde (2,96%), indiquant que ces souches ont d'abord émergé et circulé en Afrique avant d'être diffusées au reste du monde ([Hannoun et al., 2005](#)).

Enfin, le génotype D (avec ses différents sous génotypes) est présent aussi en Afrique. Il est quasiment le seul retrouvé dans les pays du Maghreb, notamment le nouveau sous génotype D7 en Tunisie ([Khelifa and Thibault, 2009](#)) ([Meldal et al., 2009](#)). Il a été aussi décrit en Afrique Subsaharienne : les sous génotypes D3, D4 en Afrique du Sud; D4 au Ghana et en Somalie ([Candotti et al., 2007](#)) ([Norder et al., 2004](#)).

D'autre part, dans les pays où plusieurs génotypes co-circulent, des infections mixtes et des événements de recombinaisons génétiques peuvent survenir et entraîner l'émergence de souches hybrides qui peuvent alors être transmises. Ainsi, des recombinants HBV/A-E au Nigeria ([Olinger et al., 2006](#)), au Cameroun ([Kurbanov et al., 2005](#)) et tout récemment en Guinée ([Garmiri et al., 2009](#)) ou des recombinants HBV/D-E en République Centrafricaine ([Bekondi et al., 2007](#)) ont été caractérisés.

Les données concernant la caractérisation moléculaire des souches virales sont limitées ou inexistantes dans la plupart des pays d'Afrique Subsaharienne, malgré un fort taux de prévalence de l'HBV.

### 1.4.2.2 Génotypes HDV

Il existe très peu de données moléculaires sur l'HDV en Afrique. Le génotype HDV-1 est ubiquitaire et est aussi présent en Afrique (figure 14) ([Shakil et al., 1997](#)) ([Zhang et al., 1996b](#)).

La découverte des nouveaux génotypes « africains », HDV-5 à HDV-8, a été faite au sein de notre laboratoire à Avicenne, sur des souches virales de patients originaires d'Afrique Subsaharienne, infectés dans leur pays d'origine ([Radjef et al., 2004](#)) ([Le Gal et al., 2006](#)). Ceux-ci ont cependant été isolés dans quelques études qui ont été entreprises en Afrique, notamment au Gabon où les génotypes HDV-1, -7, et -8 ont été décrits et au Cameroun où les génotypes HDV-1, -5 et -7 ont été retrouvés ([Makuwa et al., 2008](#)) ([Kay and Zoulim, 2007](#)) ([Foupouapouognigni et al., 2011](#)).

## **1.5 Buts du travail : Etude de l'épidémiologie moléculaire de l'HBV et de l'HDV en mauritanie et dans la région du sahara**

### **1.5.1 Eléments d'histoire de la Mauritanie et de la région du Sahara Africain**

La Mauritanie est un état récent, dont une partie des frontières est héritées de la colonisation. Il a cependant une spécificité culturelle.

Il semble que cette partie du Sahara soit occupée depuis longtemps par l'Homme. Les premiers Mauritaniens sont certainement en premier lieu les populations noires venues du Sud, qui pour une partie d'entre-elles étaient sédentaires. Ces populations pourraient être les ancêtres des Soninkés présents en Mauritanie et au Mali. Un autre peuple, dont l'origine reste mystérieuse, est aussi présent dès l'Antiquité : les Peuls. Ils sont certainement venus de l'Est et se sont installés au Sud du Sahara dans la région du Sahel. Le Sahel désigne une bande de territoires marquant la transition à la fois floristique et climatique entre le domaine saharien nord et les savanes du domaine soudanien, où les pluies sont substantielles au sud.

Actuellement les Toucouleurs de la vallée du fleuve Sénégal parlent la langue des Peuls, se réclament de ces derniers en tant que Halpoularens (ceux qui parlent le poular, la langue des Peuls).

Le troisième groupe qui depuis l'Antiquité est majoritaire, est celui des ancêtres des Berbères. Ces hommes blancs ont eux aussi des origines très mal connues. Ils viennent du Nord vers le premier millénaire avant l'ère actuelle.

A partir du 8<sup>ème</sup> siècle, une grande partie du Sahara occidental est alors sous la domination de l'empire du Ghana, qui exerce son influence dans le Sahel sur le delta

intérieur du Niger et dans la haute vallée du Sénégal du 8<sup>ème</sup> au 13<sup>ème</sup> siècle. La capitale du Ghana, l'actuelle Koumbi-Saleh, est située au Sud-Est de l'actuel territoire mauritanien. L'empire est prospère et bénéficie des nombreux gisements d'or de Guinée qu'il contrôle. Le commerce y est important et bien organisé, mais il n'y a pas de contact avec le nord du Sahara. (*Callies de Salies, 1997*)

Les premières incursions arabes au Sahara occidental avaient un but de conquête et d'islamisation. Si ces incursions n'établirent aucune domination, elles permirent cependant, après un accord conclu avec les Sanhadjas, fédération de différentes tribus berbères, de faire pénétrer plus au Sud l'Islam, et d'apprendre l'existence du riche et puissant empire du Ghana.

Pendant les 8<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> siècles, les expéditions se succèdent depuis Sidjilmassa jusqu'à Awdaghost, oasis qui semble déjà prospère. Avec l'avènement des Umayyades et des Fatimides d'Ifrikiya, la demande en or pour le monnayage se développe. Le commerce transsaharien devient régulier. Des caravanes partent du Sous, chargées de cuivre, d'argent, de produits artisanaux et de verroteries jusqu'à Awdaghost où ils rencontrent les marchands noirs venus du Ghana. Ils en repartent avec un or de bonne qualité, ne nécessitant aucun affinage avant la frappe des dinars d'or. Cette route constitue le premier pont entre le pays des Noirs et le Maghreb. La ville d'Awdaghost, d'abord peuplée de berbères Sanhadjas, accueille de plus en plus de marchands venus du Nord.

A partir du 13<sup>ème</sup> mais surtout du 15<sup>ème</sup> siècle, l'arrivée des tribus arabes Hassan va achever l'arabisation de la Mauritanie en modifiant considérablement la culture berbère préexistante. L'infiltration est progressive et les résistances sont fortes. Aux 17<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> siècles vont se fonder les émirats du Trarza, du Brakna, du Tagant, du Hodh et de l'Adrar. Il s'ensuivra des conflits incessants jusqu'au 19<sup>ème</sup> entre les différentes tribus arabes et berbères.



Au delà des conflits, les arabes se sont mélangés à la population d'origine berbère ou noire, constituant au fil des siècles le groupe aujourd'hui majoritaire en Mauritanie, les Arabo-berbères ou Maures. La société maure a pris son originalité avec l'arrivée progressive des tribus Hassan auxquelles elle doit sa répartition en castes (même si le terme est impropre) et sa langue, le Hassaniya, dialecte parlé par les nouveaux arrivants. La ville de Chinguetti connaîtra aux 17<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> siècles un développement considérable.

En 1442, les premiers navigateurs portugais découvrent le Cap Blanc et Arguin. Ils implantent un comptoir pour le commerce de l'or, de la gomme arabique ainsi que des esclaves. Le commerce transsaharien est ainsi détourné au profit des Européens. Arguin est ensuite convoitée par les Anglais, les Hollandais, et les Français. En 1664, ces derniers s'y s'y établissent finalement. Le commerce se développe le long de la vallée du fleuve Sénégal, à partir de Saint-Louis. La gomme arabique et les esclaves y sont les principales marchandises convoitées.

A partir du 19<sup>ème</sup> siècle, le processus de colonisation débute. Installés au Sénégal, les Français profitent des conflits entre les émirats pour les soumettre et ainsi réaliser l'unité de l'Empire français entre l'Algérie et l'Afrique Occidentale Française. La lutte pour la possession du Maroc voisin est également un enjeu important qui s'ajoute à la volonté de pacifier la vallée du Sénégal, soumise aux rezzous des Maures.

En 1905, la Mauritanie devient territoire français et acquiert ainsi des frontières qu'elle n'avait jamais eues auparavant, étant avant tout une terre de nomades.

Le 28 novembre 1960 la Mauritanie devient indépendante et existe dans sa forme actuelle. Pays du commerce, trait d'union entre monde arabe et Afrique noire, son histoire en a fait un pays arabe musulman à la culture originale. La colonisation lui a laissé une frontière, notion auparavant inexistante et qui représente un défi : la coexistence des Négro-africains et des Maures dans une même nation mauritanienne.

### **1.5.2 Infection HBV/HDV dans la région du Sahara en Afrique**

Le portage chronique de l'HBV en Afrique est très élevé, avoisinant parfois jusqu'à 30% dans certaines régions. Le taux de prévalence de l'HBV varie en fonction des régions et les modes de transmission sont variables selon les pays en fonction notamment des politiques de sécurité transfusionnelle et des mesures générales de prévention.

Le Sahara divise ce continent en deux parties principales : l'Afrique du nord et l'Afrique sub-saharienne. Les données concernant la caractérisation moléculaire des souches virales sont limitées ou inexistantes dans la plupart des pays d'Afrique Subsaharienne, malgré un fort taux de prévalence de l'HBV.

Il existe très peu de données moléculaires sur l'HDV en Afrique. Le géotype HDV-1 est ubiquitaire et est aussi présent en Afrique (figure14) ([Zhang et al., 1996b](#)).

### **1.5.3 Buts du travail**

Les hépatites virales constituent un problème de santé publique majeur, en Afrique Subsaharienne. Les taux de prévalence de l'antigénémie HBs peuvent dépasser les 30%. Au Niger notamment, situé dans la région du Sahara, deux études, l'une ancienne chez des sujets sains ([Soubiran et al., 1987](#)), l'autre récente en population générale ([Mamadou et al., 2006](#)) font état respectivement, de taux de prévalence de l'AgHBs de 17,6% et 19,2%. Deux études, réalisées en Mauritanie dans les années 90, ont montré une prévalence de l'AgHBs de 16,8 % chez des enfants scolarisés, de 15,7 % chez les femmes enceintes et de 17 à 20 % chez les donneurs de sang ([Tognarelli et al., 1994](#)) ([Rui et al., 1998](#)). Cependant aucune étude moléculaire des souches circulantes en Mauritanie et au Niger n'a jamais été effectuée. De même aucune donnée concernant l'infection HDV n'était disponible.

Grâce à une collaboration avec le laboratoire de biologie de Niamey au Niger, nous avons pu disposer de 58 échantillons consécutifs de sérum AgHBs positif de donneurs de sang

non apparentés. Notre objectif était la caractérisation moléculaire des souches virales HBV et HDV en cas d'infection delta concomitante, ce qui a été entrepris dans cette cohorte nigérienne.

Cette étude a permis la découverte d'une souche HBV recombinante D-E formant un nouveau sous génotype que nous avons nommé HBV/D8, sur 4 des 24 échantillons testés (près de 20 % des échantillons). Cette découverte nous a conduits à nous interroger sur la circulation éventuelle de cette nouvelle souche dans d'autres pays voisins du Niger dans cette région du Sahara, la Mauritanie où nous disposons de plusieurs collaborations scientifiques avec des équipes locales.

La Mauritanie est une République islamique, indépendante depuis 1960, est un grand pays désertique de plus d'un million de km<sup>2</sup>. La population forte de plus de 3 millions d'individus comprend trois ethnies principales, les Maures Noirs (40 % de la population), les Maures Blancs (30 %) et les négros africains (30%).

Les objectifs de notre étude en Mauritanie étaient d'évaluer la prévalence des infections B et Delta, de recueillir des données épidémiologiques concernant ces infections et de caractériser les souches B/Delta circulantes dans différents groupes représentatifs de la population Mauritanienne. Cette étude en Mauritanie a obtenu un financement de l'ANRS en 2007 (projet ANRS 12166).

## 2 RESULTATS

**Résultats 1** : caracterisation moleculaire des souches HBV circulant au Niger ;

**Résultats-2** : épidémiologie moléculaire des souches HBV et HDV en Mauritanie ;

**Résultats 3** : caracterisation moléculaire des souches HBV et HDV circulant en mauritanie ;

## **2.1 Résultats 1 : caractérisation moléculaire des souches HBV circulant au Niger**

La première partie de notre travail a consisté en l'étude moléculaire des souches HBV et HDV circulant au Niger. Grâce à une collaboration avec le laboratoire de biologie de Niamey au Niger, nous avons pu disposer de 58 échantillons consécutifs de sérum AgHBs positif de donneurs de sang. Nous avons pu obtenir des séquences nucléotidiques complètes pour 24 de ces 58 échantillons, à partir desquels nous avons réalisé des études phylogénétiques complètes. Vingt de ces 24 souches (>80%) étaient de génotype E. Cependant les 4 souches restantes étaient des recombinants D-E que nous avons caractérisés complètement par des méthodes de clonage, de séquençage et à l'aide du logiciel « Simplot ». Ces souches recombinantes ont des profils quasi identiques. Les points de cassure et les régions recombinées ont été parfaitement identifiés. Ils se situent tous dans des régions connues comme des « points chauds » de recombinaison, régions impliquées dans des événements d'intégration du génome de l'HBV dans le génome cellulaire dans les mécanismes de mutagenèse insertionnelle. Dans l'une de ces souches hybrides, nous avons mis en évidence une insertion de 41 nucléotides comportant un motif de 18 nucléotides, suivi de la même séquence complémentaire et inversée. Ce type d'anomalie de séquence a été déjà décrit lors de l'analyse des séquences HBV intégrées dans des gènes cellulaires.

Les analyses phylogénétiques extensives nous ont permis sans équivoque de classer ces souches au sein d'un vrai sous génotype D, HBV/D8. De même nous avons noté une plus grande variabilité des souches nigériennes de génotype E, confirmant certaines observations dans des pays voisins comme le Bénin et indiquant une circulation plus ancienne de ces souches.

Des études prospectives sur des cohortes beaucoup plus importantes de patients vont permettre à la fois de connaître la fréquence réelle de ces souches recombinantes ainsi que leur degré de sévérité sur le plan de la maladie hépatique et de l'oncogenèse en particulier.

Cette étude a donné lieu à une publication dans la revue *Journal of General Virology* 2010;91:1609-20: **“A Novel Hepatitis B Virus (HBV) Subgenotype D (D8) Strain, Resulting From Recombination Between Genotypes D And E, Is Circulating In Niger Along With HBV/E Strains.”**

## A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains

Mariama Abdou Chekaraou,<sup>1</sup> Ségolène Brichler,<sup>1,2†</sup> Waël Mansour,<sup>3†</sup> Frédéric Le Gal,<sup>1</sup> Aminata Garba,<sup>4</sup> Paul Dény<sup>1,5</sup> and Emmanuel Gordien<sup>1,2</sup>

Correspondence  
Emmanuel Gordien  
emmanuel.gordien@avc.aphp.fr

<sup>1</sup>Service de Bactériologie, Virologie, Hygiène, Hôpital Avicenne, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Laboratoire Associé au Centre National de Référence des Hépatites B, C et Delta, UFR Santé Médecine Biologie Humaine, Université Paris 13, Bobigny, France

<sup>2</sup>INSERM U845, Université Descartes – Paris 5, Paris, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Bactériologie, Virologie, Hygiène Hospitalière, CHU d'Angers, Angers, France

<sup>4</sup>Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital National de Niamey, Niamey, Niger

<sup>5</sup>INSERM U871, Lyon, France

Niger is a west African country that is highly endemic for hepatitis B virus (HBV) infection. The seroprevalence for HBV surface antigen (HBsAg) is about 20%; however, there are no reports on the molecular epidemiology of HBV strains spreading in Niger. In the present study, HBV isolates from the sera of 58 consecutive, asymptomatic, HBsAg-positive blood donors were characterized. Genotype affiliation was determined by amplification, sequencing and phylogenetic analysis of the preS1, polymerase/reverse transcriptase (RT/Pol) and precore (preC)/C regions. The first series of results revealed that different genomic fragments clustered with different genotypes on phylogenetic trees, suggesting recombination events. Twenty-four complete genomic sequences were obtained by amplification and sequencing of seven overlapping regions covering the whole genome, and were studied by extensive phylogenetic analysis. Among them, 20 (83.3%) were classified unequivocally as genotype E (HBV/E). The remaining four (16.7%) clustered on a distinct branch within HBV/D with strong bootstrap and posterior probability values. Complete molecular characterization of these four strains was achieved by the Simplot program, bootscanning analysis and cloning experiments, and enabled us to identify an HBV/D–E recombinant that formed a new HBV/D subgenotype spreading in Niger, tentatively named D8. Moreover, 20 new complete HBV/E nucleotide sequences were determined that exhibited higher genetic variability than is generally described in Africa. One was found to be a recombinant containing HBV/D sequences in the preS2 and RT/Pol regions. Taken together, these data suggest that, in Niger, genetic variability of HBV strains is still evolving, probably reflecting ancient endemic HBV infection.

Received 2 November 2009  
Accepted 5 February 2010

### INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection remains a major public health problem, particularly in Africa, although data for precisely estimating the burden of HBV infection are lacking. It is estimated that 2 billion people worldwide are

or have been infected with HBV (WHO: [http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB\\_who.cdscr.lyo2002\\_2.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_who.cdscr.lyo2002_2.pdf)), among whom over 360 million are in a chronic carrier state with a high risk of developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Ganem & Prince, 2004; Lee *et al.*, 1997; Lok, 2004). About 70–140 million of these carriers live in Africa, and about 250 000 of the 1.3 million HBV-related deaths recorded each year throughout the world occur in Africa (Andernach *et al.*, 2009; Hubschen *et al.*, 2008; Kramvis & Kew, 2007; Kramvis *et al.*, 2002; Mulders *et al.*, 2004). HBV belongs to the family *Hepadnaviridae* and is characterized by a partially double-stranded circular DNA genome of

†These authors contributed equally to this work.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences determined in this study are FN594748–FN594771.

A supplementary list of additional GenBank sequences used in this study is available with the online version of this paper.

approximately 3.2 kb in length. The HBV genome is generated by reverse transcription from an intermediate 3.5 kb RNA referred to as the pre-genomic RNA. The HBV genome encodes four partially overlapping open reading frames (ORFs): the surface (preS1, preS2, S), core (preC, C), polymerase (Pol) and X genes, respectively. High genetic variability is another feature typical of HBV, related to the absence of proofreading activity of the viral polymerase during the reverse transcription step of genome replication. To date, eight genotypes (A–H) have been established based on intergroup divergence of >7.5% in the complete nucleotide sequence (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002; Kramvis *et al.*, 2008; Norder *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1988; Stuyver *et al.*, 2000). Recently, a ninth genotype isolated in Laos (Olinger *et al.*, 2008a) and Vietnam (Hannoun *et al.*, 2000; Olinger *et al.*, 2008b; Tran *et al.*, 2008) and tentatively termed 'I' was proposed, although it is still subject to debate (Kurbanov, 2008). In addition, a tenth genotype provisionally termed genotype 'J' was isolated from a Japanese patient (Tatematsu *et al.*, 2009). Further extensive phylogenetic analyses of HBV genotypes in different studies worldwide have resulted in recognition of several subgenotypes within genotypes, A (A1–A5), B (B1–B8), C (C1–C7), D (D1–D7) and F (F1–F4), defined by >4% intra-genotypic divergence but <7.5% (Cavinta *et al.*, 2009; Hubschen *et al.*, 2009; Kramvis *et al.*, 2008; Lusida *et al.*, 2008; Meldal *et al.*, 2009; Mulyanto *et al.*, 2009; Norder *et al.*, 2004; Nurainy *et al.*, 2008; Schaefer, 2007). Several large-scale studies carried out in a number of African countries have disclosed the emergence of a trend in the distribution of genotypes. HBV/E is the most prevalent genotype in Africa, spreading in a vast crescent, with a span from Senegal to Namibia. In contrast, HBV/A strains are relatively rare, and are found mainly in southern, eastern and central Africa (Hubschen *et al.*, 2009; Kramvis & Kew, 2007; Kramvis *et al.*, 2002; Owiredu *et al.*, 2001), whilst HBV/D is the dominant genotype in northern Africa (Ayed *et al.*, 2007; Bahri *et al.*, 2006; Ezzikouri *et al.*, 2008; Khelifa & Thibault, 2009; Meldal *et al.*, 2009). However, although HBV/E strains are predominant in Africa, they show a low genetic diversity. In contrast, several subgenotypes of genotype A (A1–A5) and a potential new subgenotype identified in Rwanda (Hubschen *et al.*, 2009) have been reported in Africa (reviewed by Andernach *et al.*, 2009; see also references herein). Similarly, three of the seven subgenotypes identified so far for HBV/D (D1, D3 and D7) were isolated in Africa – in Egypt, South Africa and Tunisia, respectively (Kramvis & Kew, 2007; Meldal *et al.*, 2009).

Moreover, in countries in which several genotypes circulate, co-infections have been described and recombination events may occur, leading to the emergence of hybrid strains that can become the dominant subgenotype prevailing in certain geographical regions. For example, a recombinant between HBV/C and HBV/D is the dominant subgenotype circulating in Tibet (Cui *et al.*, 2002). In Africa, such recombination events have also been described, including

recombinants A–D (Owiredo *et al.*, 2001), A–E (Garmiri *et al.*, 2009; Kurbanov *et al.*, 2005), D–E–A and the G insertion (Olinger *et al.*, 2006). Very recently, new HBV/D–E recombinants were identified in the Central African Republic, Ireland (in a west African patient), Tunisia and Guinea, with all of them sharing the same recombination profile (Bekondi *et al.*, 2007; Garmiri *et al.*, 2009; Laoi & Crowley, 2008; Meldal *et al.*, 2009). Interestingly, Niger is situated in the Sahara region, between the Maghreb (Algeria, Morocco and Tunisia) in the north, where HBV/D is predominant (Khelifa & Thibault, 2009), and Mali, Burkina Faso, Benin and Nigeria in the west and south, where HBV/E is predominant (Hubschen *et al.*, 2008; Kramvis & Kew, 2007). Two earlier studies showed that Niger is a region highly endemic for HBV infection, with an HBV surface antigen (HBsAg) seroprevalence ranging from 17.6% (Soubiran *et al.*, 1987) to 29.8% (Cenac *et al.*, 1995). In the latter study, this rate reached 73% in patients with hepatic diseases. A more recent survey conducted in the general population gave a rate of 19.2% HBsAg seroprevalence (Mamadou *et al.*, 2006). However, no molecular study on the HBV genome has been performed in Niger. In the present study, we aimed to explore the molecular epidemiology of HBV strains spreading in Niger. We found that, along with HBV/E strains, a new prevalent subgenotype D, provisionally termed D8 and resulting from recombination events between HBV/D and HBV/E, is currently circulating in Niger.

## RESULTS

### Nucleotide sequences and phylogenetic analyses

Several nucleotide sequences of HBV strains from 58 serum samples of HBV-infected blood donors in Niger were characterized: 32 in the preS1 region, 27 in the reverse transcriptase region of the polymerase (RT/Pol) and 33 in the preC/C region. Using this first set of sequences, HBV genotyping was performed by phylogenetic analysis by comparison with HBV sequences of genotypes A–H retrieved from GenBank. Almost all strains were classified unequivocally as HBV/E: 28 (87.5%), 23 (85.2%) and 33 (100%) for the preS1, RT/Pol and preC/C regions, respectively. However, four strains, referred to as bne272, bne281, bne367 and bne442, showed a different affiliation on the phylogenetic trees according to the genomic fragments considered. Indeed, in the preS1 and preC/C regions, these four strains clustered on a distinct branch within HBV/E sequences supported by strong bootstrap and Bayesian posterior probability (BPP) values, whilst in RT/Pol, they belonged to genotype D, suggesting recombination events. Sequencing of the entire genome of all these strains was performed and 24 complete genomic sequences were obtained, which were then subjected to extensive phylogenetic analyses. All previous results were confirmed. Indeed, 20 of the 24 Nigerien sequences (83.3%) were distributed within the HBV/E reference sequences group,



close to two sequences from Ghana and one from Benin, whilst the remaining four (bne272, bne281, bne367 and bne442) formed a cluster within either HBV/D or HBV/E, according to the genomic region analysed. When considering the preS1 region and preC/C ORF, bne272, bne281, bne367 and bne442 formed a branch within HBV/E supported by bootstrap and BPP values of 65/80 and 100/100, respectively (Fig. 1a, e). However, when considering the preS/S, Pol and X ORFs and the complete genomic sequence, these four sequences formed a distinct cluster within HBV/D supported by strong bootstrap and BPP values of 96/100, 100/100, 100/100 and 98/100, respectively (Fig. 1b–d, f). It is noteworthy that, in the X ORF tree, bne272, bne281, bne367 and bne442 strains were close to strains belonging to subgenotypes D4 and D7.

### Characterization of new prevalent HBV/D–E recombinant strains in Niger

To further characterize these new isolates (bne272, bne281, bne367 and bne442), we compared their full-length sequence with 202 HBV/D published sequences. As summarized in Table 1, these strains belonged to genotype D, with a mean divergence of 5.1% (ranging from 3.87 to 6.76%). These values are within the 7.5% divergence that defines a subgenotype (Kramvis *et al.*, 2008; Norder *et al.*, 2004). The inter-genotype divergence was >10% except for HBV/E (7.62%). As expected, because of recombination, these four recombinant HBV/D–E and bne HBV/E strains were close, with the nucleotide divergence ranging from 6.83 to 7.79%.

We therefore compared our HBV/D–E isolates with the different HBV/D subgenotypes already described, including the recently proposed HBV/D6 and HBV/D7. The inter-subgenotype divergence ranged from 4.30% (with HDV/D7) to 5.89% (with HBV/D5) and the intra-subgenotype divergence within these four bne strains ranged from 1.96 to 2.95%, with a mean value of 2.55% (Table 1). Taken together, according to the definition of a subgenotype (Kramvis *et al.*, 2008; Norder *et al.*, 2004), these data clearly indicated a potential novel subgenotype of HBV genotype D (Fig. 1f; Table 1).

On the other hand, clustering in different positions according to phylogenetic analyses strongly indicated hybrid strains resulting from recombination events between HBV/D and HBV/E sequences. Thus, Simplot and bootscanning analyses were carried out using full-length reference sequences of genotypes A–H to determine

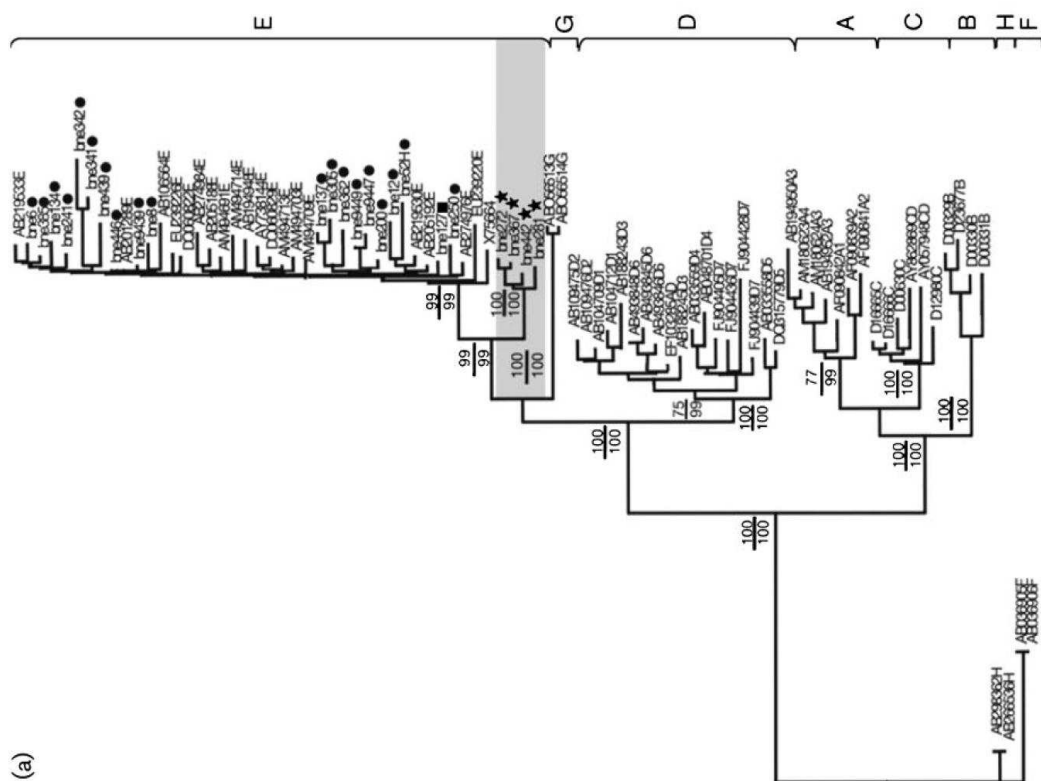
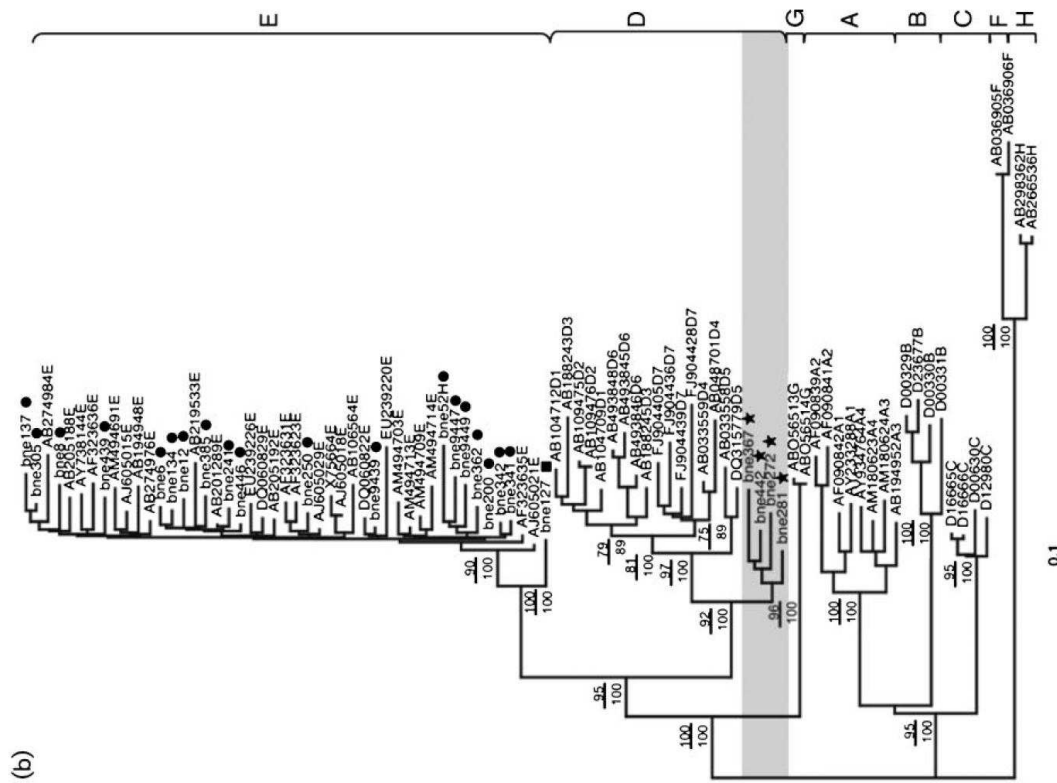
the recombinant sites in these four isolates. As depicted in Fig. 2, these new HBV/D–E recombinant strains, tentatively named HBV/D8, contained two recombinant fragments: one comprising a large part of the preC/C gene (500–700 bp), including (for bne281 and bne442) or not (for bne272 and 367) preC and the 3' end of the X region, and the other containing the beginning of the preS1 gene region (~250 bp). Four main breakpoints were identified around nt 1600 (for bne281 and bne442) and 1900 (for bne272 and 367), nt 2400, 2800 and 3000 (Fig. 2a–d).

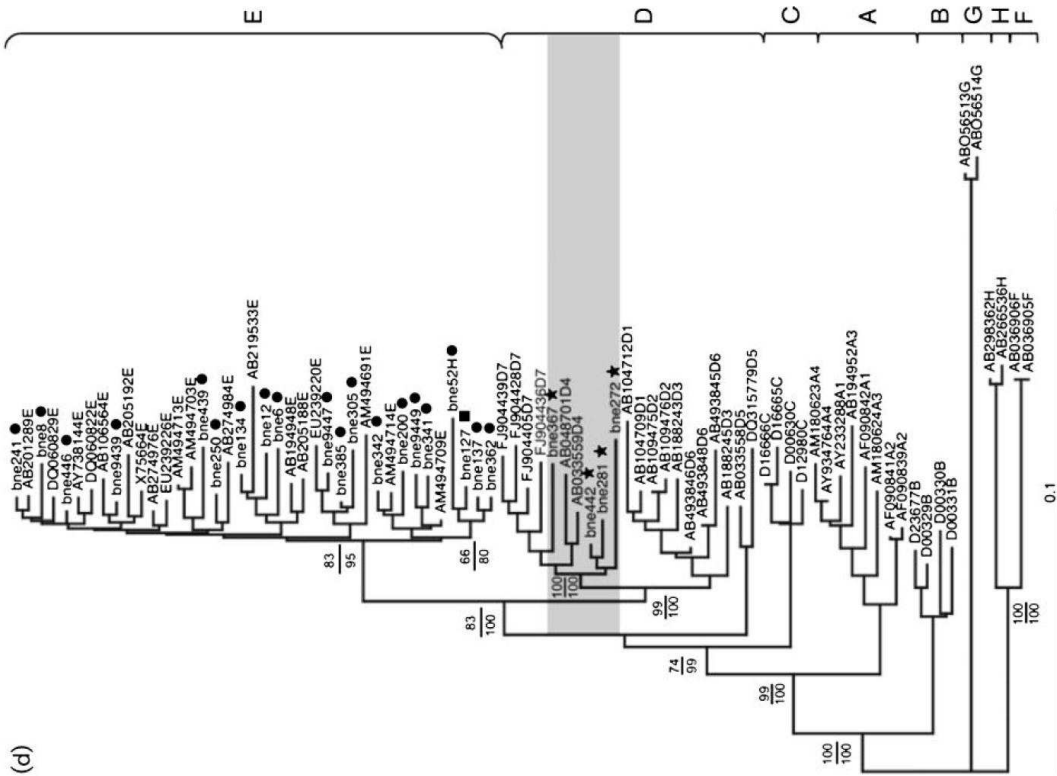
To confirm the recombination event, cloning and sequencing of the preS1 and X–preC regions that encompassed the recombination points were performed. Ten clones for each recombinant region for the four strains were sequenced and phylogenetically analysed. No mixed infection was observed and all sequences of the corresponding region were identical to the initial sequence and clustered together on phylogenetic trees (data not shown).

As for the HBV/E strains, the overall genome size of these recombinant D–E strains was 3212 nt, except for bne272, which was 3253 nt long. Whilst classified in genotype D, they did not have the common 33 nt deletion in the pre-S1 region specific for genotype D. The bne272 strain possessed a 41 bp insertion, just after nt 1826 (Fig. 2c), with the sequence GAAGAGCTCAAGCTTTCCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTT. This sequence was composed of an 18 nt motif (underlined) followed by the exactly inverted complementary sequence (bold) of this motif, followed by five Ts. Interestingly, this sequence was inserted between the start codon of the preC gene, just 9 nt after the ATG and the direct repeat 1 (DR1) region corresponding to the 5' end of the negative strand of the HBV genome. This insertion creates a stop codon at position 1836, in the preC gene, leading to the discontinuation of HBV e antigen (HBeAg) synthesis. It should be noted that bne272 also had the specific mutations/variants in the basal core promoter (A1762T and G1764A) and preC region (G1896A). This latter mutation was also found in bne281 and bne367 but not in bne442. In addition, this 41 bp insertion led to disruption of the stop codon of the X gene, leading to an aberrant X ORF with 126 additional nucleotides.

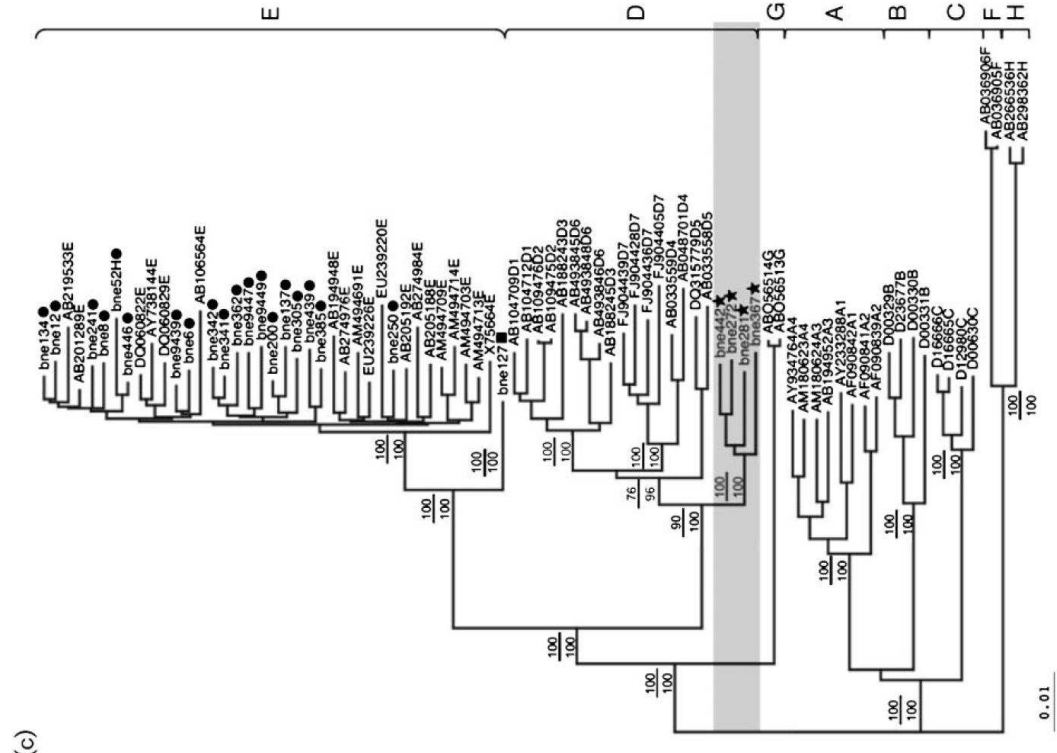
In summary, this study characterized a prevalent new subgenotype D, which we propose to name HBV/D8, found in nearly 20% of our samples, resulting from well-defined recombination events between HBV/D and HBV/E sequences involving the X–preC and preS1 regions.

**Fig. 1.** Phylogenetic analysis of HBV strains isolated from Niger compared with reference sequences of each genotype (A–H). Genetic distances were estimated by the Kimura two-parameter matrix, and phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining method. GenBank accession numbers of all published sequences used, followed by the letter of the corresponding genotype or subgenotype, are indicated. Nigerien sequences are referred to as 'bne' followed by the number of the strain. Black circles indicate HBV/E bne strains; the black square corresponds to the recombinant HBV/E–D described in Results. Black stars indicate newly characterized subgenotype D8 strains (shaded). Bootstrap (numerator) and BPP (denominator) values are shown along each main node. The regions of the genome analysed were: (a) pre-S fragment; (b) preS/S ORF; (c) Pol ORF; (d) preC/C ORF; (e) X ORF; (f) entire genome. Bars indicate nucleotide substitutions per site.

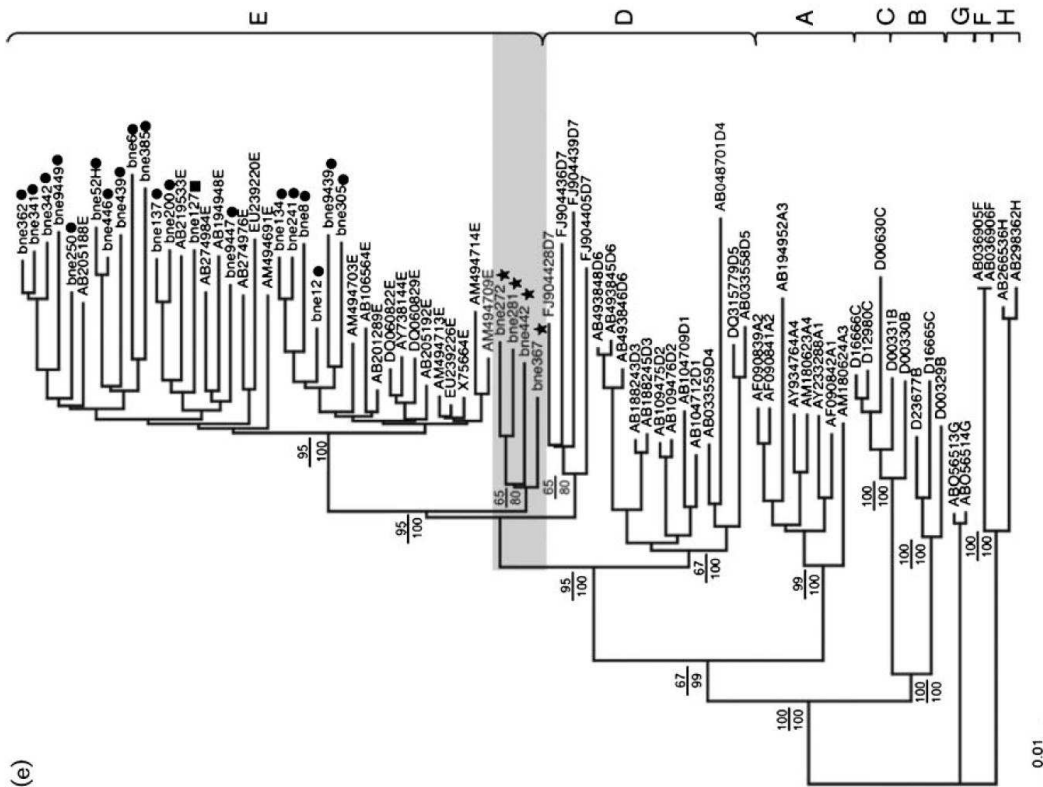
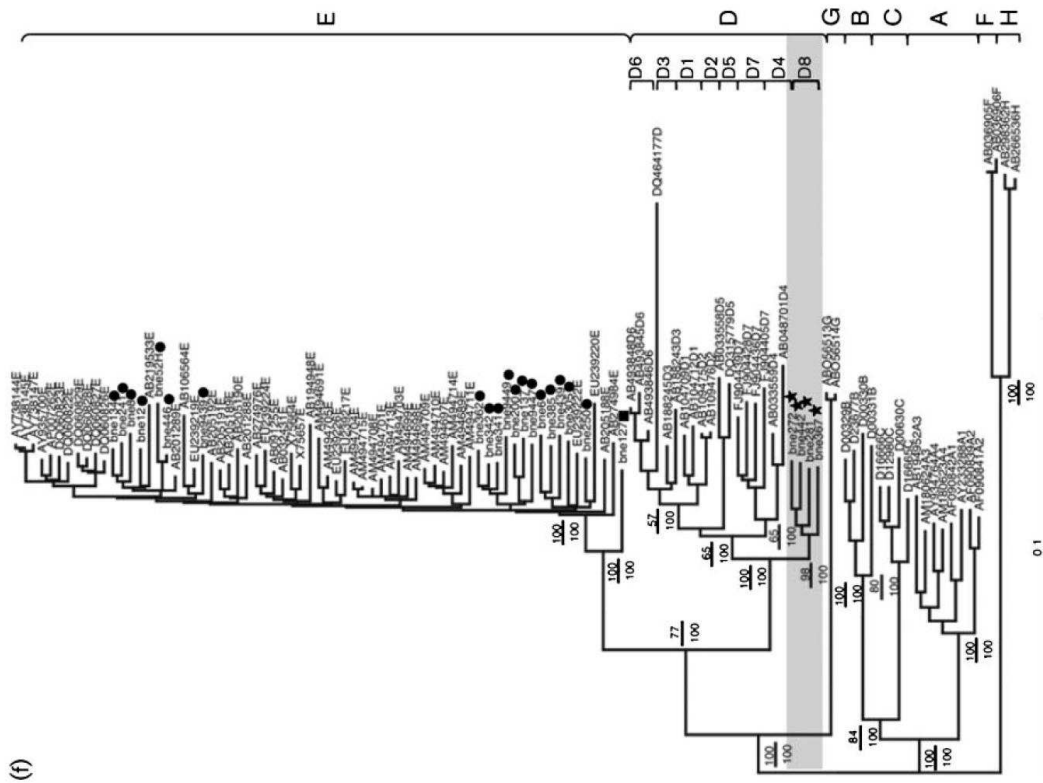




(d)



(c)



**Table 1.** Comparison of nucleotide differences (%) between the four Nigerien (bne) recombinant HBV/D–E isolates (bne 272, bne281, bne367 and bne442) and reference sequences representing genotypes A–H and all described HBV/D subgenotypes

Genotype/subgenotype	n	Divergence (%)	
		Mean	Range
<b>Genotype</b>			
A	10	11.16	9.42–12.93
B	10	11.94	10.58–13.67
C	10	11.48	10.23–13.32
D	202	5.1	3.87–6.76
E	10	7.62	6.46–9.84
F	10	14.75	13.98–16.03
G	4	12.06	11.00–13.94
H	4	15.0	14.16–16.23
<b>Subgenotype</b>			
D1	79	5.06	4.65–6.65
D2	47	5.14	4.47–5.85
D3	62	5.54	4.43–6.76
D4	5	4.40	3.87–5.35
D5	2	5.89	4.40–6.11
D6	3	5.37	4.85–5.78
D7	4	4.30	4.02–4.83
D8	4	2.55	1.96–2.95

### HBV/E strains are predominant in Niger and show greater genetic variability than generally described in Africa

More than 80% of HBV strains spreading in Niger belonged to genotype E, as reported in western and sub-Saharan Africa. Despite its hyperendemicity, HBV/E is characterized by weak genetic variability throughout Africa, i.e. about 1.75% (Andernach *et al.*, 2009;  $n=69$ ). Here, we have provided 20 new complete HBV/E sequences. The mean intra-genotype divergence, excluding bne127 (see below), with 99 published HBV/E sequences was 2.55%, ranging from 0.009 to 4.42%, and among HBV/E Nigerien sequences themselves, divergence ranged from 1.34 to 3.80% with a mean value of 2.85%. Compared with the study of Andernach *et al.* (2009), the genetic variability of Nigerien sequences was significantly higher than other available HBV/E sequences ( $P=0.004$ ).

Moreover, in this study, another recombinant E–D strain was characterized. The bne127 strain formed a distinct branch within the genotype E group on phylogenetic trees in the preS/S and Pol ORFs, and in complete genome sequences with good bootstrap and BPP values (Fig. 1b, c, f). This recombinant sequence comprises the first 340 nt of the preS2 (nt 98–438) and 495 nt (nt 778–1273) within the 3' end of the Pol region of the HBV/D genotype (Fig. 2e).

In summary, our data show that HBV/E is the dominant genotype circulating in Niger. HBV/E sequences exhibited higher genetic variability than that generally described in

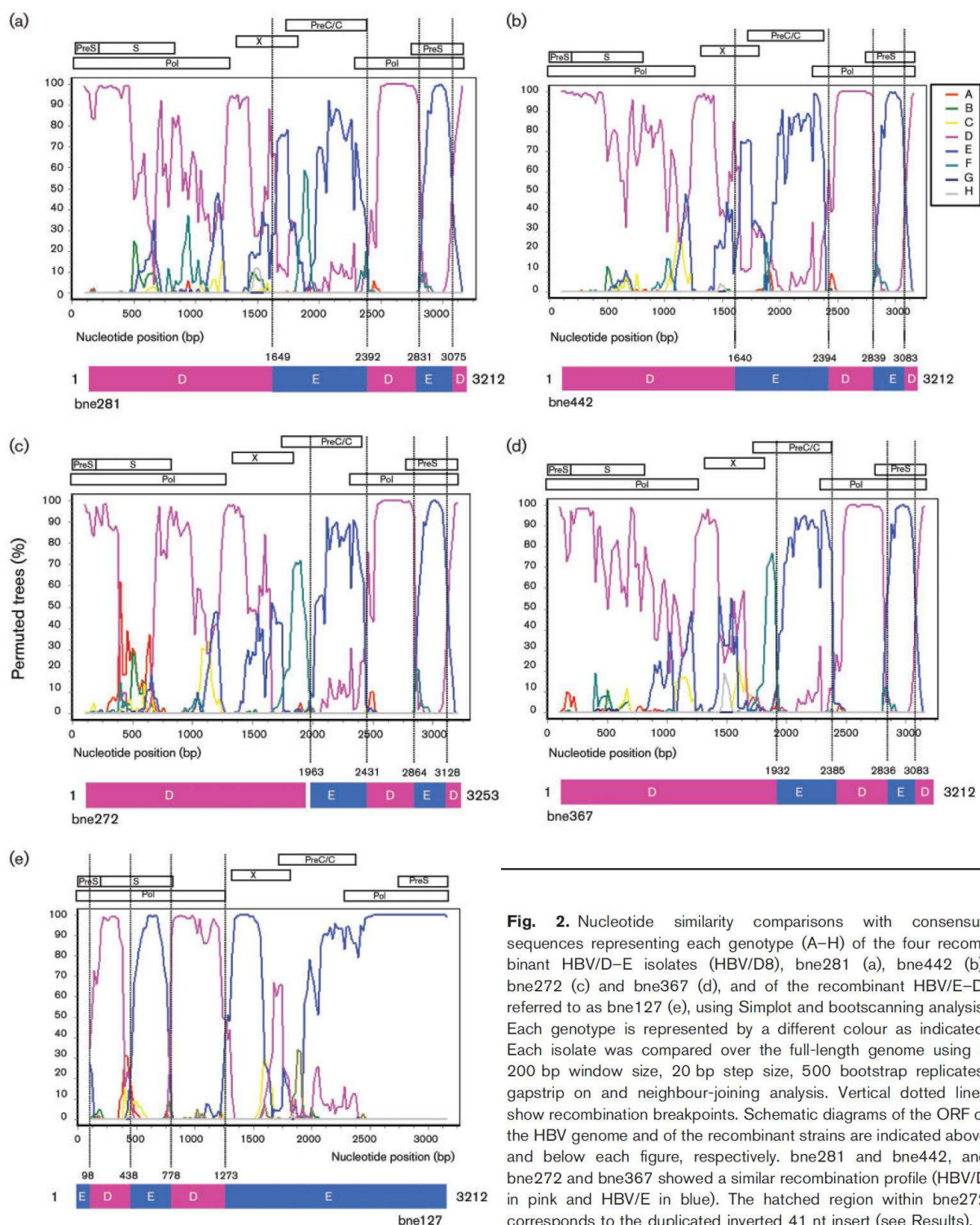
Africa and are still evolving, probably reflecting ancient endemic HBV infection.

## DISCUSSION

Niger is highly endemic for HBV infection, with an HBsAg seroprevalence of about 20%. We provide here the first molecular study on HBV strains isolated in a cohort of infected Nigerien blood donors. Near the borders (Mali, Burkina Faso, Benin, Guinea and Nigeria) where the majority of the population lives, over 80% of circulating strains in Niger belong, as expected, to the HBV/E genotype. However, sequences from Nigerien HBV strains showed higher variability over the complete genome (3% mean genetic diversity) than that generally found within the HBV/E group (1.73%) (Hubschen *et al.*, 2008). Such diversity has also been described in Benin and is probably related to the large number of infected individuals and to more ancient infection in those countries.

Another important finding of this study was that nearly 20% of the characterized HBV strains were recombinants between HBV/D and HBV/E, with a well-defined pattern. These strains clearly form a new subgenotype within genotype D that we propose to name HBV/D8. Firstly, these strains were isolated in healthy unrelated blood donors. Secondly, the four complete genomic sequences characterized here formed a strongly supported phylogenetic group within HBV/D sequences. Lastly, the mean inter-subgenotype nucleotide divergence compared with 202 HBV/D reference sequences of all described HBV/D subgenotypes was  $5.1 \pm 0.58\%$ .

Recombination events require co-infection with more than one genotype in the same patient. Interestingly, Niger is located between the Maghreb (Algeria in the north) where HBV/D strains are dominant (Ayed *et al.*, 2007; Bahri *et al.*, 2006; Ezzikouri *et al.*, 2008; Khelifa & Thibault, 2009; Meldal *et al.*, 2009) and tropical sub-Saharan west Africa where HBV/E is prevalent (Andernach *et al.*, 2009; Garmiri *et al.*, 2009; Hubschen *et al.*, 2008). Moreover, Niger is also historically a pastoral nomad society, with records of several population migrations, which may well account for the spread of HBV strains of different genotypes in the Nigerian population, leading to the emergence of recombinant strains. Indeed, further analysis of the molecular organization of these recombinant strains disclosed common identical points of recombination: (i) in X–preC (nt 1600–2000); (ii) at the 3' end of the core gene, around nt 2400; (iii) in the Pol–preS1 region, around nt 2800; and (iv) at the end of the preS1 region, around nt 3000. Interestingly, these breakpoints were located in previously described hot-spot recombination and integration regions of the HBV genome (Dejean *et al.*, 1984; Nagaya *et al.*, 1987; Pineau *et al.*, 1998). The so-called cohesive region of the genome, comprising the direct repeat regions (DR1 and DR2), was often involved in this process. Similarly, Hino *et al.* (1991) showed that this same HBV DNA region



**Fig. 2.** Nucleotide similarity comparisons with consensus sequences representing each genotype (A–H) of the four recombinant HBV/D–E isolates (HBV/D8), bne281 (a), bne442 (b), bne272 (c) and bne367 (d), and of the recombinant HBV/E–D, referred to as bne127 (e), using Simplot and bootscanning analysis. Each genotype is represented by a different colour as indicated. Each isolate was compared over the full-length genome using a 200 bp window size, 20 bp step size, 500 bootstrap replicates, gapstrip on and neighbour-joining analysis. Vertical dotted lines show recombination breakpoints. Schematic diagrams of the ORF of the HBV genome and of the recombinant strains are indicated above and below each figure, respectively. bne281 and bne442, and bne272 and bne367 showed a similar recombination profile (HBV/D in pink and HBV/E in blue). The hatched region within bne272 corresponds to the duplicated inverted 41 nt insert (see Results).

covering nt 1855–1915, comprising DR1, was indispensable for enhancement of a recombination assay (Hino *et al.*, 1991). After analysing 99 complete HBV sequences, Morozov *et al.* (2000) described homologous recombination between different genotypes and confirmed similar regularity in the distribution of recombinant sites in the vicinity of DR1 and at the 3' end of the core gene.

Elsewhere in Africa, several hybrid strains have been described as involving HBV/E and genotypes A, D and G (Bekondi *et al.*, 2007; Garmiri *et al.*, 2009; Kurbanov *et al.*, 2005; Laoi & Crowley, 2008; Meldal *et al.*, 2009; Mulders *et al.*, 2004; Olinger *et al.*, 2006). Molecular analyses often found these same recombinant sites. It is noteworthy that these hot-spot sites are also involved in virus–virus and virus–cell DNA integration events in hepatocellular carcinoma (HCC), linked to HBV. In this setting, in the bne272 strain, we found a 41 nt insert composed in part of an 18 nt motif followed by the exact inverted complementary sequence followed by five Ts. Such an inverted duplication has already been described and was associated with integrated HBV in HCC (Tokino *et al.*, 1987). Whether or not such a strain might have a higher capacity for integration into the genome of the host cell remains to be explored.

Taken together, these data and our findings in HBV sequences in Niger strongly suggest that these new recombinant HBV/D–E strains circulate and are transmitted within the population. However, larger-scale surveys are necessary in Niger and in the Saharan area to confirm the spread and high (17%) prevalence of this new HBV subgenotype, HBV/D8. Similarly, studies in chronically

infected patients will need to be conducted to explore a potential association with HCC occurrence in these patients.

In this study, we also described one HBV/E sequence (bne127) that formed a strong distinct branch with 100% bootstrap and BPP within genotype E, over the preS/S and Pol regions and the complete genome sequence (Fig. 1b, c, f). The breakpoint sites were located within the preS2–S and 3'-end Pol regions (Fig. 2e). Depending on the variability of Nigerien HBV/E strains, a study of the overall prevalence of this HBV/E–D recombinant might be of interest. Surprisingly, whilst recombinant HBV/D–E strains were found at a rather high prevalence in our sampling, no HBV/D strain was identified in Niger. This could be due to the small size of our cohort and to the greater severity of the disease linked to HBV/D (Ganne-Carrié *et al.*, 2006; Schaefer, 2007). Indeed, our cohort was composed of healthy blood donors. Further studies in larger cohorts are needed to fully investigate the genetic variability of HBV in Africa.

Finally, this study highlights the question of the genetic variability and classification of HBV genetic groups (Bollyky *et al.*, 1996; Simmonds & Midgley, 2005). Homologous or heterologous recombination, as well as the replication process of the HBV genome involving an RNA polymerase lacking a proofreading function, along with immune pressure on the scale of individuals or in ethnic groups, may account for this diversity. The molecular epidemiology of HBV strains in Niger, with the emergence of new prevalent HBV subgenotype D8, strongly indicates that HBV is still evolving genetically.

**Table 2.** Primers used for DNA amplification and sequencing

Fragment/primers	Nucleotide sequence (5'→3')	Position (nt)	Direction
<b>PreS1</b>		2817–2839	Sense
P1S	TCACCATATTCTTGGGAACAAGA		
P2AS	TTCTGAACCTGGAGCCACCA	80–61	Antisense
<b>PreS–Pol</b>			
P8S	TGAGAGACACTCATCCTCA	3179–3197	Sense
P6AS	CCTTGAACARGAGTCGTGCA	543–524	Antisense
<b>RT/Pol</b>			
Pol1b	GGACTATCAAGGTATGTT	448–465	Sense
Pol2	TAACCCCATCTTTTTGTTTT	863–844	Antisense
<b>Pol–X</b>			
P7S	TATATGGATGATGTGGTATTGGG	736–758	Sense
P9AS	GCAGGATCCAGTTGGCAG	1408–1391	Antisense
<b>X–preC</b>			
P10S	GATCCATACTGCGGAACCTCC	1263–1282	Sense
P5AS	CCTCAAGGTCGGTCGTTGAC	1701–1682	Antisense
<b>PreC/C</b>			
HB7ES	TGGAGACCACCGTGAACGCC	1609–1628	Sense
HB7R2d	CCTGAGTGCWGTATGGTGAGG	2068–2048	Antisense
<b>PreC–preS1</b>			
P4S	TAGATACCGCCTCAGCTC	1992–2009	Sense
P3AS	TGGTGAATGATTCTTCCC	2899–2881	Antisense

## METHODS

**Samples.** Sera were collected from 58 consecutive, asymptomatic, unrelated, HBsAg-positive blood donors from Niamey in Niger who gave informed written consent. Samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed.

**DNA extraction, amplification and sequencing.** DNA extraction was performed using a QIAmp MinElute Virus Vacuum kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. In a first series of experiments, three regions of the HBV genome were amplified and sequenced: preS1 (nt 2817–80), the reverse transcriptase region of the polymerase (RT/Pol) (nt 448–863) and preC/C (nt 1609–2068). Sequencing of the whole genome was performed by amplification and sequencing of four additional fragments to cover the entire genome: preS–Pol (nt 3179–543), Pol–X (nt 736–1408), X–preC (nt 1263–1701) and preC–preS1 (1992–2899). The different sets of primers used are listed in Table 2. To reduce the risk of failure, the entire HBV genome was amplified first, using primers P1 and P2 as described by Gunther *et al.* (1995), followed by nested PCR using the above primers. Purified PCR products were sequenced bidirectionally using a BigDye Terminator v. 3.1 kit (Applied Biosystems). After purification, sequences of amplified nucleic acids were determined using an automated DNA sequencer ABI PRISM 3100 Analyzer (Applied Biosystems).

**Phylogenetic analyses.** The sequences obtained were compared with sequences of the eight HBV genotypes (A–H) retrieved from GenBank. Alignments were carried out using CLUSTAL\_X software. The Kimura two-parameter model integrated into PAUP\* v. 4.0b6 software was used to calculate genetic distance and pairwise distance comparisons. Phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining method. GenBank accession numbers for the reference sequences used in the phylogenetic analyses are specified in Fig. 1. For easier reading of phylogenetic trees, each accession number is followed by the letter and number of the corresponding genotype and subgenotype. To confirm the reliability of phylogenetic tree topologies, bootstrap reconstruction was carried out 10 000 times. Bayesian inference (MrBayes software v. 3.1.2) was also used to reconstruct the phylogenetic trees and to attribute a clade credibility of the branching patterns. For each set, two parallel Markov chain Monte Carlo searches of four classes, including one cold chain with a  $0.5^{\circ}\text{C}$  melting temperature, were run for  $2 \times 10^6$  generations using a generalized time reversible (GTR) model of evolution with a gamma distribution of variable sites of four classes (alpha parameter=0.5). To focus on the results reaching apparent stationary phase, the first 25% of the runs were discarded and the remaining tree dataset was computed using strict consensus and majority rule algorithms to evaluate the posterior probabilities of the branching pattern (Altekar *et al.*, 2004; Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

**Recombination investigation.** Recombination events for sequences with conflicting phylogenetic positions were searched for using the Simplot program and bootscanning analysis (Lole *et al.*, 1999). Briefly, each sequence was compared with a consensus sequence of each HBV genotype (A–H) in order to identify the breakpoints. The analysis was carried out using a window size of 200 bp, a step size of 20 bp, 500 bootstrap replicates, gapstrip on and neighbour-joining analysis.

Furthermore, cloning experiments were performed to confirm breakpoint regions in the intergenotypic recombinants. The PCR products of the preS1 and X–preC regions were cloned into the TOPO vector (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. White colonies were picked and grown in Luria–Bertani

medium with ampicillin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). For each recombinant strain, ten clones were sequenced using M13 universal primers.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the staff of the National Blood Transfusion Center in Niamey, Niger, for collecting and testing donor samples. We thank Dr Olivier Lada for technical help in sequencing and cloning experiments. We thank Professor Françoise Lunel-Fabiani for critical reading of this paper. We thank Andréa Gordien for help in redaction of the manuscript. M. A. C. received financial support from the ANRS (Agence Nationale de la Recherche contre le SIDA et les Hépatites Virales) and the INVS (Institut National de Veille Sanitaire) via the University Laboratory of Virology of Avicenne Hospital, associated with the 'Centre National de Référence des Hépatites B, C et Delta'. P. D. is a recipient of a grant from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) attributed to the University Laboratory of Virology of Avicenne Hospital.

## REFERENCES

- Altekar, G., Dworkadas, S., Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2004). Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* **20**, 407–415.
- Andernach, I. E., Hübschen, J. M. & Muller, C. P. (2009). Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. *Rev Med Virol* **19**, 231–240.
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H. & Magnius, L. O. (2002). Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* **83**, 2059–2073.
- Ayed, K., Gorgi, Y., Ayed-Jendoubi, S., Aouadi, H., Sfar, I., Najjar, T. & Ben Abdallah, T. (2007). Hepatitis B virus genotypes and precore/core-promoter mutations in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Infect* **54**, 291–297.
- Bahri, O., Cheikh, I., Hajji, N., Djebbi, A., Maamouri, N., Sadraoui, A., Mami, N. B. & Triki, H. (2006). Hepatitis B genotypes, precore and core promoter mutants circulating in Tunisia. *J Med Virol* **78**, 353–357.
- Bekondi, C., Olinger, C. M., Boua, N., Talarmin, A., Muller, C. P., Le Faou, A. & Venard, V. (2007). Central African Republic is part of the West-African hepatitis B virus genotype E crescent. *J Clin Virol* **40**, 31–37.
- Bollyky, P. L., Rambaut, A., Harvey, P. H. & Holmes, E. C. (1996). Recombination between sequences of hepatitis B virus from different genotypes. *J Mol Evol* **42**, 97–102.
- Cavinta, L., Sun, J., May, A., Yin, J., von Meltzer, M., Radtke, M., Barzaga, N. G., Cao, G. & Schaefer, S. (2009). A new isolate of hepatitis B virus from the Philippines possibly representing a new subgenotype C6. *J Med Virol* **81**, 983–987.
- Cenac, A., Pedrosa, M. L., Djibo, A., Develoux, M., Pichoud, C., Lamothe, F., Trepo, C. & Warter, A. (1995). Hepatitis B, C, and D virus infections in patients with chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma: a comparative study in Niger. *Am J Trop Med Hyg* **52**, 293–296.
- Cui, C., Shi, J., Hui, L., Xi, H., Zhuoma, Quni, Tsedan & Hu, G. (2002). The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J Gen Virol* **83**, 2773–2777.
- Dejean, A., Sonigo, P., Wain-Hobson, S. & Tiollais, P. (1984). Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5350–5354.
- Ezzikouri, S., Chemin, I., Chafik, A., Wakrim, L., Nourilil, J., Malki, A. E., Marchio, A., Dejean, A., Hassar, M. & other authors (2008). Genotype



- determination in Moroccan hepatitis B chronic carriers. *Infect Genet Evol* 8, 306–312.
- Ganem, D. & Prince, A. M. (2004). Hepatitis B virus infection – natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350, 1118–1129.
- Ganne-Carrié, N., Williams, V., Kaddouri, H., Trinchet, J. C., Dziri-Mendil, S., Alloui, C., Hawajri, N. A., Dény, P., Beaugrand, M. & Gordien, E. (2006). Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *J Med Virol* 78, 335–340.
- Garmiri, P., Loua, A., Haba, N., Candotti, D. & Allain, J. P. (2009). Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa. *J Gen Virol* 90, 2442–2451.
- Gunther, S., Li, B. C., Miska, S., Kruger, D. H., Meisel, H. & Will, H. (1995). A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 69, 5437–5444.
- Hannoun, C., Norder, H. & Lindh, M. (2000). An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J Gen Virol* 81, 2267–2272.
- Hino, O., Tabata, S. & Hotta, Y. (1991). Evidence for increased in vitro recombination with insertion of human hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9248–9252.
- Hubschen, J. M., Andernach, I. E. & Muller, C. P. (2008). Hepatitis B virus genotype E variability in Africa. *J Clin Virol* 43, 376–380.
- Hubschen, J. M., Mugabo, J., Peltier, C. A., Karasi, J. C., Sausy, A., Kirpach, P., Arendt, V. & Muller, C. P. (2009). Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide. *J Med Virol* 81, 435–440.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Khelifa, F. & Thibault, V. (2009). Characteristics of hepatitis B viral strains in chronic carrier patients from north-east Algeria. *Pathol Biol (Paris)* 57, 107–113 (in French).
- Kramvis, A. & Kew, M. C. (2007). Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology Res* 37, S9–S19.
- Kramvis, A., Weitzmann, L., Owiredo, W. K. & Kew, M. C. (2002). Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 83, 835–839.
- Kramvis, A., Arakawa, K., Yu, M. C., Nogueira, R., Stram, D. O. & Kew, M. C. (2008). Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 80, 27–46.
- Kurbanov, F. (2008). When should “I” consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol* 82, 8241–8242.
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., Fujiwara, K., Sugauchi, F., Mbanya, D., Zekeng, L., Ndembu, N., Ngansop, C., Kaptue, L. & other authors (2005). A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 86, 2047–2056.
- Laoi, B. N. & Crowley, B. (2008). Molecular characterization of hepatitis B virus (HBV) isolates, including identification of a novel recombinant, in patients with acute HBV infection attending an Irish hospital. *J Med Virol* 80, 1554–1564.
- Lee, D. S., Huh, K., Lee, E. H., Lee, D. H., Hong, K. S. & Sung, Y. C. (1997). HCV and HBV coexist in HBsAg-negative patients with HCV viraemia: possibility of coinfection in these patients must be considered in HBV-high endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* 12, 855–861.
- Lok, A. S. (2004). Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127, S303–S309.
- Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W. & Ray, S. C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73, 152–160.
- Lusida, M. I., Nugrahaputra, V. E., Soetjijpto, Handajani, R., Nagano-Fujii, M., Sasayama, M., Utsumi, T. & Hotta, H. (2008). Novel subgenotypes of hepatitis B virus genotypes C and D in Papua, Indonesia. *J Clin Microbiol* 46, 2160–2166.
- Mamadou, S., Laouel Kader, A., Rabiou, S., Aboubacar, A., Soumana, O., Garba, A., Delaporte, E. & Mboup, S. (2006). Prevalence of the HIV infection and five other sexually-transmitted infections among sex workers in Niamey, Niger. *Bull Soc Pathol Exot* 99, 19–22 (in French).
- Meldal, B. H., Moula, N. M., Barnes, I. H., Boukef, K. & Allain, J. P. (2009). A novel hepatitis B virus subgenotype, D7, in Tunisian blood donors. *J Gen Virol* 90, 1622–1628.
- Morozov, V., Pisareva, M. & Groudinin, M. (2000). Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus. *Gene* 260, 55–65.
- Mulders, M. N., Venard, V., Njayou, M., Edoth, A. P., Bola Oyefolu, A. O., Kehinde, M. O., Muyembe Tamfum, J. J., Nebie, Y. K., Maiga, I. & other authors (2004). Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis* 190, 400–408.
- Mulyanto, Depamede, S. N., Surayah, K., Tsuda, F., Ichiyama, K., Takahashi, M. & Okamoto, H. (2009). A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. *Arch Virol* 154, 1047–1059.
- Nagaya, T., Nakamura, T., Tokino, T., Tsurimoto, T., Imai, M., Mayumi, T., Kamino, K., Yamamura, K. & Matsubara, K. (1987). The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 1, 773–782.
- Norder, H., Courouche, A. M. & Magnius, L. O. (1994). Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198, 489–503.
- Norder, H., Courouche, A. M., Coursaget, P., Echevarria, J. M., Lee, S. D., Mushahwar, I. K., Robertson, B. H., Locarnini, S. & Magnius, L. O. (2004). Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47, 289–309.
- Nurainy, N., Muljono, D. H., Sudoyo, H. & Marzuki, S. (2008). Genetic study of hepatitis B virus in Indonesia reveals a new subgenotype of genotype B in east Nusa Tenggara. *Arch Virol* 153, 1057–1065.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1988). Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69, 2575–2583.
- Olinger, C. M., Venard, V., Njayou, M., Oyefolu, A. O., Maiga, I., Kemp, A. J., Omilabu, S. A., le Faou, A. & Muller, C. P. (2006). Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol* 87, 1163–1173.

## **2.2 Résultats-2 : épidémiologie moléculaire des souches HBV et HDV en Mauritanie**

### **2.2.1 Première partie de l'étude (femmes enceintes et consultants au Centre Hospitalier de Nouakchott (CHN) et au centre d'Arafat)**

Cette étude a permis l'inclusion de 1966 sujets. La première cohorte était représentée par 1020 femmes enceintes âgées de 14 à 47 ans, suivies dans un Centre de Santé Publique à Nouakchott. Cette étude a été réalisée entre décembre 2008 et mars 2009. La deuxième cohorte était composée de 414 patients consultant au Centre Hospitalier de Nouakchott entre le 1<sup>er</sup> et le 21 juillet 2008. Le troisième groupe de sujets incluait 532 sujets âgés de 14 à 76 ans qui consultaient dans un Centre de Santé en périphérie de Nouakchott d'octobre 2008 à juillet 2009. Les sujets âgés de moins de 14 ans ou qui avaient une histoire connue d'hépatite B ont été exclus de l'étude. Tous ces sujets ont subi une interview qui a permis le recueil de données épidémiologiques et démographiques tels l'âge, la polygamie, le nombre d'enfants, le groupe ethnique, la nationalité, le niveau d'éducation, les revenus et les facteurs de risques d'infection connus comme la transfusion sanguine, les tatouages, piercings, circoncision, antécédents médicaux et chirurgicaux.

Chez les femmes enceintes et les consultants, respectivement, la prévalence de l'AgHBs (10,7% et 18,3%) et l'Anticorps anti-HBc (66,3% et 76,5%) ont confirmé la haute endémicité de l'HBV en Mauritanie.

Les anticorps anti-Delta ont été retrouvés chez 19% des consultants Ag HBs+ et chez 14.7% des femmes enceintes Ag HBs+.

Les génotypes de l'HBV ont pu être déterminés chez 23 femmes enceintes et 58 consultants. Le génotype D a été retrouvé dans 53% des cas ; suivi du E chez 35% et du A chez 12%. Plusieurs subgénotypes de l'HBV/D ont été identifiés, y compris HBV/D1 et /D7, ainsi que le subgénotype HBV/D8, décrit récemment au Niger. Parmi les 10 cas HBV/A caractérisés dans

cette étude, deux appartenait au groupe HBV/A2 européen et les 8 autres se regroupaient au sein du groupe HBV/A sur une branche distincte des autres sous génotypes connus.

Les génotypes HDV ont été étudiés sur 31 échantillons : 10 femmes enceintes et 21 consultants. 28 étaient de génotype 1 et 3 de génotype 5. Dans 10 cas, nous avons pu génotyper les souches HBV et HDV. De façon intéressante, les HDV génotype 5 étaient associés aux souches HBV de génotype E. Les 9 HDV-1 étaient associés dans 8 cas au génotype D et 1 avec génotype E.

Chez les femmes enceintes, l'exposition au HBV était associée en analyse multivariée au niveau d'éducation ( $p=0,005$ ), à l'éthnie ( $p=0,02$ ), à des antécédents de transfusion ( $p=0,040$ ) et à la profession ( $p=0,031$ ). Chez les consultants, elle était associée au sexe masculin ( $p=0,002$ ). La présence d'Ac anti Delta était associée en analyse multivariée chez les consultants, à l'âge ( $p=0,009$ ) et au sexe masculin ( $p=0,025$ ).

Cette première partie de l'étude confirme la forte prévalence de l'hépatite B et de l'hépatite Delta en Mauritanie, ainsi que la grande diversité génétique des souches HBV circulante et la présence notamment du nouveau sous génotype HBV/D8.

Cette étude a été acceptée mais non encore publiée (sous presse) au Journal of Medical Virology

## ***TITLE PAGE***

### **Prevalence, Risk Factors and Molecular Epidemiology of Hepatitis B and Delta Virus in Pregnant Women and in Patients in Mauritania**

Wael Mansour <sup>1,2</sup>, F- Zahra Fall Malick <sup>3</sup>, Ahmad Sidiya <sup>4</sup>, Elkhilil Ishagh <sup>5</sup>, Mariama Abdou Chekaraou <sup>6</sup>, Pascal Veillon <sup>1,2</sup>, Alexandra Ducancelle <sup>1,2</sup>, Ségolène Brichler <sup>6</sup>, Frédéric Le Gal <sup>6</sup>, Baidy Lo <sup>3</sup>, Emmanuel Gordien <sup>6</sup> and Françoise Lunel-Fabiani <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Virologie, CHU Angers, 4, rue Larrey 49933, Angers Cedex 9, France

<sup>2</sup> Laboratoire HIFIH, UPRES EA3859 Faculté de Médecine d'Angers, 1, rue Haute de Reculée 49045 Angers France.

<sup>3</sup>Institut National de recherche en santé publique (INRSP), Avenue Jamal Abel Nasser, BP: 695 Nouakchott, Mauritanie.

<sup>4</sup>Centre de Santé Publique d'Arafat, Nouakchott, Mauritanie

<sup>5</sup>Département de Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier National (CHN), BP: 612, Nouakchott, Mauritanie

<sup>6</sup>Laboratoire de Bactériologie, Virologie, Hygiène, associé au CNR des hépatites B, C et Delta, Hôpitaux universitaires de Paris Seine Saint Denis, site Avicenne; Université Paris 13, 125, boulevard de Stalingrad 93009 Bobigny Cedex, France

**Running title:** HBV and HDV in Mauritania

\* Correspondence to: Prof. Françoise Lunel-Fabiani

Laboratoire de virologie, Département de biologie des agents infectieux et pharmaco-toxicologie, CHU d'Angers, 4, rue Larrey, 49933 ANGERS Cedex 9

**Telephone:** +33 2 41 35 47 09

**Fax:** +33 2 41 35 41 64

**E-mail:** FrLunel-Fabiani@chu-angers.fr

**ABSTRACT: (243Words)**

No recent data are available on Hepatitis B virus (HBV) and Hepatitis Delta virus (HDV) prevalence in Mauritania. One thousand and twenty pregnant women and 946 patients visiting for routine checkups were screened for HBV and HDV infection. Demographic, epidemiological, ethnic, clinical and biological data were recorded. HBV and HDV genotypes were determined by sequencing and phylogenetic analyses. In the pregnant women and patients cohorts respectively, the prevalence of HBsAg (10.7% and 18.3%) and anti-HBcAb (66.3% and 76.5%) indicated high HBV endemicity. In pregnant women, exposure to HBV was significantly associated in multivariate analysis with education level, ethnicity, blood transfusion and occupation. HDV antibodies (HDVAb) were found in 14.7% of pregnant women. In patients, HBsAg was found less frequently in females than in males. Again in multivariate analysis, exposure to HBV was significantly correlated with gender (males), and HDVAb positivity with age and gender. The HBV DNA viral load was  $>3$  log IU/mL in only 10.1% of pregnant women and in 17.3% of patients. HDV-RNA was detectable in 21 (67.7%) of the 31 patients positive for HDVAb, and in 11 of the 16 pregnant women positive for HDVAb (68.8%). The most frequent HBV genotypes were: HBV/D, 53%; HBV/E, 35%; and HBV/A, 12%. Sub-genotyping revealed HBV/D1, /D7, and the recently described /D8. HDV genotypes were: HDV-1, 90.3% and HDV-5, 9.7%. This study confirms the high prevalence of HBV and HDV infections in Mauritania and demonstrates the high genetic diversity of HBV in this country.

**Key words:** hepatitis B virus, hepatitis Delta virus, Mauritania, epidemiology, genotypes.

## ***TEXT***

### **Introduction:**

Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis delta virus (HDV) are highly endemic in Africa. There, HBV transmission may occur vertically at parturition, horizontally among children <5 years of age, or later either sexually or iatrogenically. The prevalence of serological markers indicating exposure to HBV in sub-Saharan Africa is very high, up to 90%, although the prevalence of HBV carriers varies substantially between regions, from less than 7% to as high as 35% [Mulders et al., 2004]. Worldwide, more than 350 million people are chronically infected by HBV, despite the fact that a safe and effective vaccine has been available since 1982. The infection causes an estimated 500,000 to 700,000 deaths every year [WHO, 2004]. Fifteen to 20 million HBsAg carriers are thought to be equally infected by HDV, a satellite virus of HBV [Abou-Jaoude and Sureau, 2007; Rizzetto et al., 1980]. HDV may co-infect with HBV or occur later as a super-infection in subjects with chronic HBV, with different clinical courses and outcomes [Farci et al., 2007; Fattovich et al., 2000; Rizzetto, 2009; Romeo et al., 2009]. Despite their co-speciation, HBV and HDV do not share a similar geographical distribution. Although the prevalence of HDV has declined dramatically in the past decade, it is still endemic in many regions, including sub-Saharan Africa [Gaeta et al., 2000; Makuwa et al., 2008; Wedemeyer et al., 2007]. Both HBV and HDV genera are classified into eight genotypes, respectively A to H and 1 to 8 [Kramvis et al., 2005; Le Gal et al., 2006; Radjef et al., 2004]. Two HBV genotypes, HBV/E and HBV/A (subgenotypes 1, 3, 4, and 5) are predominant in Central, South, and West Africa [Huy et al., 2006; Makuwa et al., 2006]. HBV/D is the only genotype in North Africa. Recently, two new HBV/D subgenotypes, /D7 and /D8, have been described respectively in Tunisia [Meldal et al., 2009] and in Niger [Abdou Chekaraou et al., 2010].

In Mauritania, only two small studies have been conducted, and both reported a high

prevalence of hepatitis B and D: 17% and 30% respectively [Rui et al., 1998; Tognarelli et al., 1994]. In 2000, Mauritania launched an HBV vaccination program, but it was targeted only on newborn infants (6 weeks of age). The aim of the present study was to determine the seroprevalence of HBV and HDV infection among different populations in Mauritania, identify the main risk factors and analyze the genetic diversity of the spreading HBV and HDV strains.

## **Subjects and methods:**

### **Study population**

This prospective study was performed on a total population of 1966 subjects in two cohorts. The first cohort consisted of 1020 pregnant women, ranging from 14 to 47 years of age. These subjects received care within the Sabkha public healthcare setting in Nouakchott, between December 2008 and March 2009. The second cohort was composed of 946 patients: 414 consulted in the National Hospital of Nouakchott (CHN) from 1 to 21 July 2008, and 532, aged from 14 to 76, consulted in the Arafat Public Healthcare Center between October 2008 and July 2009.

Individuals aged less than 14 years or having a previous history of HBV infection were excluded.

All the subjects were interviewed for epidemiological/demographical data including age, gender, education level (as defined by the Mauritanian Ministry of Education), matrimonial status, polygamy, age at first marriage, number of children, family income, ethnic group, area of residence (coast line, river, desert), urban residence, occupation or profession. Risk factors were also recorded, i.e., past blood transfusions, hospitalization, tattooing, piercing, excision, circumcision, nosocomial exposition, syringe injections, and anti-tuberculosis and/or anti-schistosomiasis treatments. The Ethics Committee of the Mauritanian Public Health Ministry approved this study and all subjects signed a written informed consent before sample collection.

### **Serological analyses**

Blood samples (5-10 mL) were collected from all subjects and initial tests were performed in Mauritania. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) was detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (AxSYM-Abbott, Rungis, France) for the pregnant women, and with rapid tests (VIKIA-bioMérieux, France) for the patients (CHN and ARAFAT



Center). The sera were then stored at -80C° and sent to the virology laboratory of the university hospital (CHU) of Angers (France).

The sera were retested in Angers for HBsAg using ELISA and confirmed by neutralization (AxSYM-Abbott, Rungis, France). Anti-HBc antibodies (Ab) (AxSYM-Abbott, Rungis, France) were also determined in all subjects from the CHN and the ARAFAT Center, as well as in 386 HBsAg-negative pregnant women, matched for age and ethnic group with those who were positive for HBsAg (109 patients). Hepatitis Delta antibodies were determined using an ELISA test (Diasorin, Antony, France) in all HBsAg-positive subjects.

**Molecular analyses:** Molecular tests, including viral load and genotyping, were performed in the virology laboratory of the Angers CHU or in the virology unit of the Avicenne CHU in Bobigny (France).

HBV-DNA and HDV-RNA extractions were performed using the NucliSENS Easy Mag platform (bioMerieux Boxtel, The Netherlands), according to the manufacturer's instructions, from 300 µL of plasma or serum; DNA and/or RNA were eluted in 50 µL of elution buffer.

HBV-DNA was measured by a quantitative assay on the NucliSENS EasyQ platform (BioMerieux- Boxtel, The Netherlands) [Deiman et al., 2008].

HDV RNA was detected by PCR using primers *900s* and *1280as*, which encompass a region conserved in all HDV genotypes, i.e., the "R0 region" (400 nt) covering the 3' end of the *HD* gene as previously described by Ivaniushina et al. [Ivaniushina et al., 2001].

HBV and HDV genotypes were determined by direct sequencing followed by phylogenetic analyses of, respectively, a 479 bp-long DNA fragment in the HBV-PreS1 region (nt 2817-80), or the HDV-*R0* region (400 nt) [Ivaniushina et al., 2001; Lindh et al., 1998].

**Phylogenetic analyses:** HBV or HDV sequences were aligned (together with reference sequences) using CLUSTAL X software. The Kimura two-parameter model included in the PAUP\* v. 4.0b6 software was used to calculate genetic distance and pairwise distance

comparisons. Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method. To confirm the reliability of phylogenetic tree topologies, bootstrap reconstruction was carried out 1000 times.

### **Statistical analyses**

The dataset was organized and analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software, version 15.0. Chi-square and Fischer's exact test (two-tailed) were used to compare categorical variables, and the unpaired Student's t-test was used for continuous variables. A *P*-value <0.05 was considered as statistically significant. Variables linked to HBV or HDV status with a *P*-value of 0.20 or less in univariate analysis were included in a multivariate logistic regression model with a stepwise procedure.

Odds ratios (OR) were calculated using the maximum likelihood method.

Three ethnic groups were considered: White Moor, Black Moor and African ethnicities (for Pulaar, Soninké, Woloof and others). To analyze HBV risk factors, HBsAg and anti HBcAb-positive subjects (HBV+) were grouped. Age groups were classified in quartiles. Risk factors for parenteral exposure (i.e., hospitalization, tattooing, piercing, excision, circumcision, nosocomial exposition, syringe injections, and anti-tuberculosis and/or anti-schistosomiasis treatment), except blood transfusions, were grouped together.

## **Results:**

### **Demographic data**

#### **Pregnant women**

The mean age of the pregnant women was  $26.5 \pm 6.3$  (14- 47) years. Nearly 30% of them were primiparous. Most of them were Mauritanian (85.6%), unemployed (70.4%), and had 3 children or less (80.3%). The mean age of the first marriage was  $18.6 \pm 4.9$  (8-37) years. According to ethnicity, the cohort was composed of Black Moor (45.2%), White Moor (12.3%) and others (42.5%). Only 23.4% of them had a secondary school education level. 93.3% of the women had a low socioeconomic status (monthly income less than 20,000 Mauritanian Ouguiya (MRO), approximately 70 USD, data not shown).

#### ***patients (Arafat and CHN)***

The mean age of the patients was  $36.4 \pm 13.9$  years. Approximately 55% were married. Although 59% were employed, only 38.2% had monthly income of more than 20,000 MRO (70 USD).

The ethnic groups within this population were distributed as follows: White Moor (57.5%); Black Moor (25.9%) and others (16.6%).

## **HBV and HDV serological markers**

### ***Pregnant women***

Prevalence of HBsAg: One hundred and nine pregnant women (10.7%) were HBsAg-positive.

The mean age was not significantly different between HBsAg-positive and -negative women ( $27.3 \pm 6.4$  vs  $26.4 \pm 6.2$  yrs) ( $P = 0.18$ ). HBsAg prevalence increased with age (9.9% in women  $< 30$  vs. 12.5% in women  $\geq 30$ ), but was not statistically significant ( $P=0.23$ ).

The prevalence of HBsAg did not differ according to education level, ethnics, number of children, or occupation/profession. Blood transfusion was not correlated to HBsAg carriage.

Exposure to HBV (HBcAb and HBsAg-positive subjects): HBcAb was positive in 328 (109 HBsAg-positive subjects and 219 HBsAg-negative subjects) of the 495 women tested (66.3%). Univariate analyses of risk factors for a history of HBV are shown in Table I-a. Exposure to HBV correlated significantly with age, education level, number of children, ethnics groups, history of blood transfusion and student status.

The results of multivariate analysis are shown in Table I-b. Ethnicity (Black Moor), a history of transfusion, and occupation status were associated with the presence of HBV markers.

Prevalence of HDVAb: HDVAb were present in 16 of the 109 HBsAg-positive pregnant women (14.7%). HDVAb-positive women were significantly older than those who were negative for HDVAb ( $37.7 \pm 13.3$  vs.  $31.8 \pm 14.0$ ,  $P < 0.001$ ). HDVAb positivity was significantly correlated with age ( $> 33$  years) and ethnic groups in univariate analyses (table-II). However, no risk factor was significantly associated with the presence of anti HDVAb in multivariate analysis.

### ***patients***

Prevalence of HBsAg: The overall prevalence of HBsAg in patients was 18.3% (173/946). The mean age was not significantly different between HBsAg carriers and non-carriers. The prevalence of HBsAg was significantly higher in males (24.4%) than in females (13.8%), ( $P < 0.001$ , [OR: 2.04 (1.46 – 2.85),  $P < 0.001$ ]) and varied significantly over the different ethnic groups: 22.7% in White Moor, 19.7% in Black Moor and 12% in African ethnicities ( $P = 0.025$ , OR: 0.47 (0.26 – 0.82),  $P = 0.008$  for the comparison between White Moor and other African ethnic groups). No other risk factor was correlated with HBsAg prevalence (data not shown).

Exposure to HBV (HbcAb and HBsAg-positive subjects): Among the patients, nearly 76.5% (667/872) were positive for HbcAb or HBsAg. In univariate analyses, the prevalence was significantly correlated with age, marriage, student status, polygamy, low education level, high family income and history of blood transfusion (Table III). However, in multivariate analysis, only gender was significantly correlated with HBV markers (OR: 2.87 (1.47 – 5.60),  $P = 0.002$ ).

Prevalence of HDVAb: Anti-HDV antibodies were found in 31 of the 162 (19.1%) HBsAg-positive patients [26 males and 5 females (m/f ratio 5.2:1); age range was 17-70 years (mean age=41.5 ±13.8 years)]. In univariate analyses, HDVAb positivity was significantly correlated with age ( $\geq 44$  years), gender and area of residence (Table IV-a). In multivariate analyses, the presence of HDVAb was significantly correlated with gender and age (table IV-b).

### **HBV and HDV molecular analyses**

HBV-DNA was quantified in the sera of all HBsAg-positive patients. The mean HBV viral load was  $1.7 \pm 1.4$  log IU/mL. Viral load was significantly higher in patients than in pregnant women ( $1.9 \pm 1.5$  vs.  $1.5 \pm 1.5$  IU/mL,  $P=0.04$ ), but it should be noted that the mean age of patients was  $36.4 \pm 13.7$  vs.  $26.5 \pm 6.3$  in pregnant women. Levels of HBV-DNA in different

age groups and according to gender are given in table V. In patients  $\geq 30$  years old, the viral load was significantly lower in females than in males. Only 11 of the 109 (10.1%) HBsAg-positive pregnant women had a viral load  $>3$  log IU/mL, and 5 of these 11 (4.6%) had a viral load exceeding 5 log IU/mL. In the patients, 30 of the 173 (17.4%) HBsAg-positive had a viral load  $>3$  log IU/mL and 9 (5.2%) had a viral load  $>5$  log IU/mL.

HBV-DNA level was significantly lower in HDVAb-positive pregnant women in comparison to those who were HDVAb-negative ( $0.9 \pm 0.3$  vs.  $1.6 \pm 1.6$ ,  $p=0.001$ ). For patients, this difference was not significant.

HDV-RNA was detectable in 21 (67.7%) of the 31 patients positive for HDVAb, and in 11 of the 16 HDVAb-positive pregnant women (68.8%).

### **HBV and HDV genotypes**

HBV genotypes could be determined in 81 samples: 23 in the pregnant women cohort and 58 in the patients cohort. HBV/D was found in 43 patients (53%), followed by HBV/E in 28 (35%) and HBV/A in 10 (12%). Several HBV/D subgenotypes were identified, including HBV/D1 and /D7, as well as the /D8 subgenotype, recently described in Niger [Abdou Chekaraou et al., 2010]. Among the 10 cases with HBV/A characterized in this study, 2 belonged to the HBV/A2 European group. Interestingly, the remaining 8 were clustered within the African HBVA sequence group, but on a distinct branch, with bootstrap indicating a putative new subgenotype or Mauritanian isolates (Figure 1).

HDV genotyping was successful in 31 sera (10 in pregnant women and 21 in patients). Among them, 28 were HDV-1 and 3 were HDV-5 (Figure 2).

In 10 patients, both HBV and HDV genotypes of the infected strains could be obtained. Nine of them were HDV-1, of which 8 were associated with HBV/D and 1 with HBV/E. The remaining case was HDV-5 associated with HBV/E.



## Discussion

Worldwide, there are approximately 400 million people chronically infected with HBV; 65 million of them reside in Africa. HBV infection, as measured by the prevalence of HBsAg, is of low to medium endemicity in the Northern African countries (2 to 7%), but hyperendemic in sub-Saharan Africa (>8%). Furthermore, HBV rates can vary intranationally, with local pockets of high endemicity. In Tunisia, for example, HBsAg seropositivity varies throughout the country, ranging from 3% to 13% with higher rates in the southern, central or western regions [Triki et al., 1997]. Studies performed in Nigeria also reported varying seroprevalence rates of 26.0%, 15.1%, 13.2% and 12.6% [Adoga et al., 2010]. An intermediate HBsAg prevalence rate can be found in some sub-Saharan regions (Kenya, Zambia, Ivory Coast, Liberia, Sierra Leone and Senegal) [Kramvis and Kew, 2007]. The prevalence of chronic HBV infection among pregnant women remains coherent with this pattern, and highly endemic areas are reported in some countries: 6.5% in Zambia, 9.5% in Gabon, 12.6% in Ghana, 13.8% in Senegal, 15.5% in Mali, 20.3% in Cameroon and 25% in Zimbabwe [Acquaye and Mingle, 1994; Candotti et al., 2007; Madzime et al., 1999; Makuwa et al., 2008; Oshitani et al., 1995; Roingard et al., 1992; Sidibe et al., 2001]. However, most of these studies were performed more than 10 years ago, and variations in the study population sizes may explain the wide gaps in HBsAg prevalence over these African countries. In the present study, HBV rates were estimated in representative groups of the Mauritanian population, i.e. pregnant women (n=1020) and patients (n=945). HBsAg prevalence rates were respectively 10.7% and 18.3%.

In agreement with previous studies, a significantly higher prevalence of HBsAg was found in males. This might be a consequence of better clearance of the infection by females, but currently there is no clear explanation for this higher HBV infection rate in males [Bwogi et al., 2009; Okpalugo and Oguntibeju, 2008; Oshitani et al., 1995] although certain behavioral



aspects (e.g., shaving, travel) may play a role.

High rates of exposure to HBV, as measured by the prevalence of anti-HBcAb and/or HBsAg, were found in pregnant women (66.3%) and in patients (76.5%). A similarly high prevalence was previously described in several western African countries [Pellizzer et al., 1994]. The Baka pygmies of eastern Cameroon have the highest exposure to HBV in Africa, with an anti-HBc prevalence of 93.6% [Ndumbe et al., 1993; Ojo et al., 1995].

In the patient cohort, using univariate analysis, the exposure to HBV was significantly correlated with age, gender, married status, polygamy, low educational level, high family income, student status and history of blood transfusion. In pregnant women, the exposure to HBV correlated significantly (again in univariate analysis) with age, education level, number of children, ethnics groups, area of residence, history of blood transfusion and student status. Intrafamilial, nosocomial and sexual transmission are probably the main sources of infection. Intrafamilial transmission may be due to sharing of facilities or overcrowding; iatrogenic transmission could occur through non-disposable surgical materials, or needles in vaccination campaigns [Drucker et al., 2001; Gall, 1954; Herbert, 1975]. Beyond sexual transmission, other factors, including percutaneous routes of transmission (barbers, piercing, or traditional practices like excision or circumcision), may also be incriminated in HBV transmission. Such results support the idea that HBV transmission in these geographical zones is mainly horizontal, as previously suggested [Dumpis et al., 2001; Kew, 1996; Martinson et al., 1998]. Viral load is a primary factor in HBV vertical or intrafamilial transmission. In pregnant women, the mean HBV DNA load in the sera was low, and most of them (89.9%) had a viral load less than 3 log IU/mL. This is consistent with the previously reported low vertical transmission rate in Africa [Drucker et al., 2001; Kew, 1996; Martinson et al., 1998]. Exposure to HBV was less frequent in students. This may be due to their younger age (less sexual transmission, etc.) and/or the fact that they are often from rich families. The role of

ethnic origins is not clear. Using univariate analyses, HBcAb rates varied significantly over ethnicities (Black Moor vs. others) in the pregnant women cohort, but not in the patients cohort. Different behavioral aspects (i.e., polygamy) might play a role in this difference, or perhaps genetic predispositions are increasing the rate of chronic infection [Guo et al., 2011] in a process similar to that present in HCV infection [Abe et al., 2010]. In multivariate analysis, exposure to HBV was significantly correlated with low education level, ethnicity, transfusion and unemployed status in pregnant women and only with gender (males) in the patients.

A high prevalence of hepatitis Delta Virus was found in the studied population. These results thus confirm those of another recent study performed in the Laboratory of Virology (CHU Angers, France), focused on Mauritanian blood donors (manuscript submitted), suggesting that this virus may represent a significant public health problem in Mauritania. Indeed, HDVAb positivity in the pregnant women and patients cohorts was 14.7% and 19.1% respectively. HDV is endemic in sub-Saharan Africa, although, similarly to HBV, the rates of HDVAb vary intranationally. In Senegal, the prevalence of HDVAb among asymptomatic HBsAg-positive subjects ranged from 4% in the north to 13% in Dakar and 44% in Pikine [Roingeard et al., 1992]. HDV has also been shown to be endemic in pregnant women in Central and West Africa (from 10% in Cameroon to 15.6% in Gabon) [Makuwa et al., 2008]. Persons with anti HDV antibodies were mainly desert-dwelling men in the patients. In both groups, exposure to HDV was associated with age. HDV infection may thus be acquired later in life compared to HBV [Djebbi et al., 2009]. This suggests a high probability of HDV transmission via iatrogenic routes, or via intrafamilial transmission [Niro et al., 1999].

Hepatitis B virus has doubtlessly been present in the region for a very long time. However, infection rates probably increased greatly at the beginning of the 20<sup>th</sup> century, likely together with HDV, when mass injection campaigns to address sleeping sickness and yellow fever

were launched in the 1920s [Drucker et al., 2001]. Earlier still, from 1917 to 1919, only six syringes were used to treat 90,000 individuals for sleeping sickness [Gall, 1954]. Furthermore, at least 35,000 immunizations against smallpox in West Africa were documented between 1893 and 1910 [Herbert, 1975].

This is the first study on the molecular epidemiology of HBV and HDV strains circulating in Mauritania. HBV/D is the main genotype found in North Africa, whereas HBV/A (mostly subgenotypes A1 or A3) and mainly HBV/E are the most frequently encountered strains in sub-Saharan Africa. This study demonstrated that three different genotypes circulate in Mauritania: HBV/D, 53.1%; HBV/E, 34.6%; and HBV/A; 12.3%. Interestingly, among the more prevalent HBV/D strains, 21% belonged to the new HBV/D8 strain recently described in Niger, a country situated equally in northwestern Africa [Abdou Chekaraou et al., 2010] (Figure 1). HBV/D7, described in Tunisia, Algeria and Morocco, and HBV/D1 were found too. Moreover, a putative new subgenotype within the HBV/A strains characterized was described in this study. These strains form a distinct cluster within the known HBV/A African strains. Several studies focused on fully characterizing these new strains are currently underway. This study demonstrated that three genotypes, HBV/A, HBV/D and HBV/E, circulate at relatively high rates in Mauritania. This diversity may be explained by the geographic position of this country, where it acts as a gateway between northern and sub-Saharan Africa.

HDV genetic variability was also analyzed. Two genotypes were identified: the ubiquitous HDV-1; and HDV-5, which has been previously described in West Africa [Le Gal et al., 2006; Radjef et al., 2004]. Interestingly, HDV-5 was isolated in the African black ethnic in this study.

In conclusion, this work represents the first large study focused on the epidemiology of HBV and HDV infection in Mauritania. The results confirmed the high prevalence (>10%) of HBV

infection in this country. Moreover, 14% rate of HDV coinfection was found. Finally, HBV and HDV genotyping in this study shed light on the high genetic diversity of the strains circulating in Mauritania.

## **Acknowledgements**

This work was supported and financed by the French National Agency for Research on AIDS and viral hepatitis (ANRS).

The authors thank Abbott, Diasorin and BioMerieux for their assistance.

The authors are grateful for all those who helped us carry out this study (ARAFAT Center, Sabkha center, National Hospital of Nouakchott and Public Health National Institute).

## **REFERENCES:**

- Abdou Chekaraou M, Brichler S, Mansour W, Le Gal F, Garba A, Deny P, Gordien E. 2010. A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains. *Journal of General Virology* 91:1609-1620.
- Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. 2010. Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. *J Hepatol* 53:439-443.
- Abou-Jaoude G, Sureau C. 2007. Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange. *J Virol* 81:13057-13066.
- Acquaye JK, Mingle JA. 1994. Hepatitis B viral markers in Ghanaian pregnant women. *West Afr J Med* 13:134-137.
- Adoga MP, Gyar SD, Pechulano S, Bashayi OD, Emiasegen SE, Zungwe T, Iperepolu OH, Agupugo C, Agwale SM. 2010. Hepatitis B virus infections in apparently healthy urban Nigerians: data from pre-vaccination tests. *J Infect Dev Ctries* 4:397-400.
- Bwogi J, Braka F, Makumbi I, Mishra V, Bakamutumaho B, Nanyunja M, Opio A, Downing R, Biryahwaho B, Lewis RF. 2009. Hepatitis B infection is highly endemic in Uganda: findings from a national serosurvey. *Afr Health Sci* 9:98-108.
- Candotti D, Danso K, Allain JP. 2007. Maternofetal transmission of hepatitis B virus genotype E in Ghana, west Africa. *J Gen Virol* 88:2686-2695.
- Deiman B, Jay C, Zintilini C, Vermeer S, van Strijp D, Venema F, van de Wiel P. 2008. Efficient amplification with NASBA of hepatitis B virus, herpes simplex virus and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* DNA. *J Virol Methods* 151:283-293.
- Djebbi A, Rebai WK, Bahri O, Hogga N, Sadraoui A, Triki H. 2009. [Serological markers, viral RNA and genotype of hepatitis delta virus in HBs antigen positive Tunisian patients]. *Pathol Biol (Paris)* 57:518-523.
- Drucker E, Alcabes PG, Marx PA. 2001. The injection century: massive unsterile injections and the emergence of human pathogens. *Lancet* 358:1989-1992.
- Dumpis U, Holmes EC, Mendy M, Hill A, Thursz M, Hall A, Whittle H, Karayiannis P. 2001. Transmission of hepatitis B virus infection in Gambian families revealed by phylogenetic analysis. *J Hepatol* 35:99-104.
- Farci P, Chessa L, Balestrieri C, Serra G, Lai ME. 2007. Treatment of chronic hepatitis D. *J Viral Hepat* 14 Suppl 1:58-63.
- Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. 2000. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* 46:420-426.
- Gaeta GB, Stroffolini T, Chiaramonte M, Ascione T, Stornaiuolo G, Lobello S, Sagnelli E, Brunetto MR, Rizzetto M. 2000. Chronic hepatitis D: a vanishing Disease? An Italian multicenter study. *Hepatology* 32:824-827.
- Gall D. 1954. The chemoprophylaxis of sleeping sickness with the diamidines. *Ann Trop Med Parasitol* 48:242-258.
- Guo X, Zhang Y, Li J, Ma J, Wei Z, Tan W, O'Brien SJ. 2011. Strong influence of human leukocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population. *Hepatology* 53:422-428.
- Herbert EW. 1975. Smallpox inoculation in Africa. *J Afr Hist* 16:539-559.

- Huy TT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K. 2006. Characteristics of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicate the endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol* 78:178-184.
- Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi M, Kiselev O, Deny P. 2001. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol* 82:2709-2718.
- Kew MC. 1996. Progress towards the comprehensive control of hepatitis B in Africa: a view from South Africa. *Gut* 38 Suppl 2:S31-36.
- Kramvis A, Kew M, Francois G. 2005. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23:2409-2423.
- Kramvis A, Kew MC. 2007. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepato Res* 37:S9-S19.
- Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, Deny P. 2006. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis* 12:1447-1450.
- Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. 1998. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 72:163-174.
- Madzime S, Adem M, Mahomed K, Woelk GB, Mudzamiri S, Williams MA. 1999. Hepatitis B virus infection among pregnant women delivering at Harare Maternity Hospital, Harare Zimbabwe, 1996 to 1997. *Cent Afr J Med* 45:195-198.
- Makuwa M, Caron M, Souquiere S, Malonga-Mouelet G, Mahe A, Kazanji M. 2008. Prevalence and genetic diversity of hepatitis B and delta viruses in pregnant women in Gabon: molecular evidence that hepatitis delta virus clade 8 originates from and is endemic in central Africa. *J Clin Microbiol* 46:754-756.
- Makuwa M, Souquiere S, Telfer P, Apetrei C, Vray M, Bedjabaga I, Mouinga-Ondeme A, Onanga R, Marx PA, Kazanji M, Roques P, Simon F. 2006. Identification of hepatitis B virus subgenotype A3 in rural Gabon. *J Med Virol* 78:1175-1184.
- Martinson FE, Weigle KA, Royce RA, Weber DJ, Suchindran CM, Lemon SM. 1998. Risk factors for horizontal transmission of hepatitis B virus in a rural district in Ghana. *Am J Epidemiol* 147:478-487.
- Meldal BH, Moula NM, Barnes IH, Boukef K, Allain JP. 2009. A novel hepatitis B virus subgenotype, D7, in Tunisian blood donors. *J Gen Virol* 90:1622-1628.
- Mulders MN, Venard V, Njayou M, Edorh AP, Bola Oyefolu AO, Kehinde MO, Muyembe Tamfum JJ, Nebie YK, Maiga I, Ammerlaan W, Fack F, Omilabu SA, Le Faou A, Muller CP. 2004. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis* 190:400-408.
- Ndumbe PM, Atchou G, Biwole M, Lobe V, Ayuk-Takem J. 1993. Infections among pygmies in the Eastern Province of Cameroon. *Med Microbiol Immunol* 182:281-284.
- Niro GA, Casey JL, Gravinese E, Garrubba M, Conoscitore P, Sagnelli E, Durazzo M, Caporaso N, Perri F, Leandro G, Facciorusso D, Rizzetto M, Andriulli A. 1999. Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence. *J Hepatol* 30:564-569.
- Ojo OS, Thursz M, Thomas HC, Ndububa DA, Adeodu OO, Rotimi O, Lawal AA, Durosini MA, Akonai AK, Fatusi AO, et al. 1995. Hepatitis B virus markers, hepatitis D virus antigen and hepatitis C virus antibodies in Nigerian patients with chronic liver disease. *East Afr Med J* 72:719-721.
- Okpalugo CE, Oguntibeju OO. 2008. Prevalence of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus in preoperative patients: potential risk of transmission to health professionals. *Pak J Biol Sci* 11:298-301.

- Oshitani H, Kasolo F, Tembo C, Mpabalwani M, Mizuta K, Luo N, Suzuki H, Numazaki Y. 1995. Hepatitis B virus infection among pregnant women in Zambia. *East Afr Med J* 72:813-815.
- Pellizzer G, Ble C, Zamperetti N, Stroffolini T, Upunda G, Rapicetta M, Chionne P, Villano U, Fabris P, de Lalla F. 1994. Serological survey of hepatitis B infection in Tanzania. *Public Health* 108:427-431.
- Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anais P, Drugan T, Trinchet JC, Roulot D, Tamby M, Milinkovitch MC, Deny P. 2004. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *J Virol* 78:2537-2544.
- Rizzetto M. 2009. Hepatitis D: thirty years after. *J Hepatol* 50:1043-1050.
- Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. 1980. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6124-6128.
- Roingeard P, Sankale JL, Dubois F, Diouf A, Bacha A, Mboup S, Goudeau A. 1992. Infection due to hepatitis delta virus in Africa: report from Senegal and review. *Clin Infect Dis* 14:510-514.
- Romeo R, Del Ninno E, Rumi M, Russo A, Sangiovanni A, de Franchis R, Ronchi G, Colombo M. 2009. A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 136:1629-1638.
- Rui WZ, Lo Baidy B, N'Diaye M. 1998. [Hepatitis B virus infection in the school milieu of Kiffa and Selibaby, Mauritania]. *Bull Soc Pathol Exot* 91:247-248.
- Sidibe S, Sacko BY, Traore I. 2001. [Prevalence of serologic markers of the hepatitis B virus in pregnant women of Bamako, Mali]. *Bull Soc Pathol Exot* 94:339-341.
- Tognarelli B, Coste J, Pradines C, Larrey D, Michel H. 1994. [Prevalence of hepatitis delta virus among asymptomatic HBs+ antigen blood donors and in HBs+ antigen hepatopathies in Mauritania]. *Gastroenterol Clin Biol* 18:176.
- Triki H, Said N, Ben Salah A, Arrouji A, Ben Ahmed F, Bouguerra A, Hmida S, Dhahri R, Dellagi K. 1997. Seroepidemiology of hepatitis B, C and delta viruses in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:11-14.
- Wedemeyer H, Heidrich B, Manns MP. 2007. Hepatitis D virus infection--not a vanishing disease in Europe! *Hepatology* 45:1331-1332; author reply 1332-1333.
- WHO. 2004. Hepatitis B vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 79:255-263.



Legends figures:

Figure 1

Phylogenetic analysis of HBV strains isolated from Mauritania compared with reference sequences of each genotype (A–H). Genetic distances were estimated by the Kimura two-parameter matrix, and phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method. The GenBank accession numbers of all the published sequences that were used are indicated, followed by the letter of the corresponding genotype or subgenotype. Mauritanian sequences are referred to as “bMr” followed by the number of the strain. (patients = pt: pt1 for GCPs from the National Hospital of Nouakchott, pt2 for patients from the Arafat Public Healthcare Center; pw = pregnant women).

Figure 2

Phylogenetic tree inferred from distance analysis (Kimura 2 parameters model) and neighbor-joining reconstruction from HDV-R0 region sequences (nt 889 to 1289).

Mauritanian sequences are referred to as “dMr” followed the number of the strain. (patients = pt: pt1 for GCPs from the National Hospital of Nouakchott, pt2 for patients from the Arafat Public Healthcare Center; pw = pregnant women). The 31 dMr sequences were compared to 53 reference sequences, gathering the 8 HDV genotypes.

	<b>HBsAg + or HBcAb +</b>		<b>HBsAg - and HBcAb -</b>		<b>P</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>
	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>			
<b>Age group (quartiles)</b>					<i>0.014</i>		
<i>Less than or equal to 22 years</i>	80	60.2	53	39.8		<i>reference</i>	
23 – 26 years	64	64.0	36	36.0		<i>1.18 (0.69 – 2.01)</i>	<i>0.55</i>
27 – 30 years	74	62.2	45	37.8		<i>1.09 (0.66 – 1.81)</i>	<i>0.74</i>
31 years or greater	110	76.9	33	23.1		<b><i>2.21 (1.31 – 3.72)</i></b>	<b><i>0.003</i></b>
<b>Educational level: secondary or higher</b>					<i>&lt;0.001</i>		
No	260	70.8	107	29.2			
Yes	68	53.1	60	46.9		<i>0.47 (0.31 – 0.70)</i>	<b><i>&lt;0.001</i></b>
<b>Matrimonial status</b>					<i>0.050</i>		
Never married	1	100.0	0	0.0		<i>NC</i>	<i>NC</i>
Married once	226	63.1	132	36.9		<i>reference</i>	
Married more than once	101	74.3	35	25.7		<b><i>1.69 (1.09 – 2.62)</i></b>	<b><i>0.020</i></b>
<b>Polygamy</b>					<i>0.19</i>		
No	294	65.3	156	34.7			
Yes	34	75.6	11	24.4		<i>1.64 (0.81 – 3.33)</i>	<i>0.17</i>
<b>Age at first marriage (median)</b>					<i>0.63</i>		
≤ 18 years	171	65.3	91	34.7			
> 18 years	156	67.5	75	32.5		<i>1.11 (0.76 – 1.61)</i>	<i>0.59</i>
<b>Number of children (median)</b>					<i>0.002</i>		
0 – 2	193	61.3	122	38.7			
> 2	135	75.0	45	25.0		<b><i>1.90 (1.26 – 2.85)</i></b>	<b><i>0.002</i></b>
<b>Monthly family income</b>					<i>1.00</i>		
Less than or equal to 50,000 MRO	325	66.3	165	33.7			
Greater than 50,000 MRO	3	60.0	2	40.0		<i>0.76 (0.13 – 4.60)</i>	<i>0.77</i>
<b>Ethnic group</b>					<i>0.014</i>		
White Moor	31	53.4	27	46.6		<i>reference</i>	
Black Moor	188	71.5	75	28.5		<b><i>2.18 (1.22 – 3.90)</i></b>	<b><i>0.008</i></b>
Other African ethnic groups	109	62.6	65	37.4		<i>1.46 (0.80 – 2.66)</i>	<i>0.22</i>
<b>Area of residence</b>					<i>0.22</i>		
Coastline	326	66.3	166	33.7		<i>reference</i>	
River	2	100.0	0	0.0		<i>NA</i>	<i>NA</i>
Desert	0	0.0	3	100.0		<i>NA</i>	<i>NA</i>
<b>Urban residence</b>					<i>0.31</i>		
No	312	33.2	155	66.8			
Yes	16	57.1	12	42.9		<i>0.66 (0.31 – 1.43)</i>	<i>0.30</i>
<b>Profession</b>					<i>0.38</i>		
All workers	92	74.2	32	25.8		<i>reference</i>	
Student	18	52.9	16	47.1		<b><i>0.39 (0.18 – 0.86)</i></b>	<b><i>0.019</i></b>
Unemployed	218	74.7	119	35.3		<i>0.64 (0.40 – 1.01)</i>	<i>0.055</i>
<b>Exposure</b>							
Blood transfusion					<i>0.011</i>		
No	307	65.0	165	35.0			
Yes	21	91.3	2	8.7		<b><i>5.64 (1.31 – 24.36)</i></b>	<b><i>0.020</i></b>
At least one parenteral exposure except blood transfusion					<i>0.38</i>		
No	7	53.8	6	46.2			
Yes	321	66.6	161	33.4		<i>1.71 (0.57 – 5.17)</i>	<i>0.34</i>

**Table 1-a: Risk factors of HBV infection (HBsAg or HBcAb-positive) in pregnant women.**

(OR: odds-ratio; N: number; MRO: Mauritanian ouguiyas (50,000 MRO ≈170 USD); NC: not calculated; NA: not applicable)

	OR (CI 95%)	P
<b>Secondary education level</b> (no vs. yes)	0.49 (0.30 – 0.81)	0.005
<b>Ethnic group</b>		0.025
White Moors	1 (reference)	
Black Moors	2.09 (1.12 – 3.89)	0.020
Other African groups	1.29 (0.67 – 2.48)	0.45
<b>Transfusion</b> (no vs. yes)	4.79 (1.07 – 21.41)	0.040
<b>Profession</b>		0.089
All workers	1 (reference)	
Student	0.76 (0.31 – 1.88)	0.56
Unemployed	0.57 (0.34 – 0.95)	0.031

**Table 1-b: Multivariate analysis of parameters associated with hepatitis B infection in pregnant women.**

(OR: adjusted odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval)

	<b>HDVAb +</b>		<b>HDVAb -</b>		<i>P</i>	<b>OR (95% CI)</b>	<i>P</i>
	<i>N</i>	(%)	<i>N</i>	(%)			
<b>Age group (quartiles)</b>					0.028		
Less than or equal to 22 years	3	10.3	26	89.7		reference	
23 – 27 years	4	13.3	26	86.7		1.33 (0.27 – 6.56)	0.72
28 – 32 years	1	4.2	23	95.8		0.38 (0.04 – 3.88)	0.41
33 years or greater	8	33.3	16	66.7		<b>4.33 (1.00 – 18.77)</b>	<b>0.050</b>
<b>Educational level: secondary or higher</b>					0.19		
No	10	12.0	73	88.0			
Yes	6	25.0	18	75.0		2.43 (0.78 – 7.58)	0.13
<b>Matrimonial status</b>							
Married once	11	14.9	63	85.1	1.00		
Married more than once	5	15.2	28	84.8		1.02 (0.33 – 3.22)	0.97
<b>Polygamy</b>					1.00		
No	15	15.0	85	85.0			
Yes	1	14.3	6	85.7		0.94 (0.11 – 8.41)	0.96
<b>Age at first marriage (median)</b>					0.79		
≤ 17 years	7	13.2	46	86.8			
> 17 years	9	16.7	45	83.3		1.31 (0.45 – 3.83)	0.62
<b>Number of children (median)</b>					0.26		
0 – 2	8	11.6	61	88.4			
> 2	8	21.1	30	78.9		2.03 (0.70 – 5.95)	0.20
<b>Monthly family income</b>					0.15		
Less than or equal to 50,000 MRO	15	14.2	91	85.8		NA	NA
Greater than 50,000 MRO	1	100.0	0	0.0			
<b>Ethnic group</b>					0.021		
White Moor	2	16.7	10	83.3		reference	
Black Moor	13	28.3	43	71.7		1.51 (0.29 – 7.79)	0.62
Other African ethnic groups	1	2.6	38	97.4		0.13 (0.01 – 1.60)	0.11
<b>Area of residence</b>					1.00		
Coastline	16	17.8	90	52.2		NA	NA
River	0	0.0	1	100.0			
Desert	0	0.0	0	0.0			
<b>Urban residence</b>					0.59		
No	16	16.0	84	84.0		NA	NA
Yes	0	0.0	7	100.0			
<b>Profession</b>					0.71		
All workers	4	14.3	24	85.7		reference	
Student	2	25.0	6	75.0		2.00 (0.29 – 13.62)	0.48
Unemployed	10	14.1	61	85.9		0.98 (0.28 – 3.44)	0.98
<b>Exposure</b>							
Blood transfusion					1.00	NA	NA
No	16	15.6	87	84.4			
Yes	0	0.0	4	100.0			
At least one parenteral exposure except blood transfusion					1.00	NA	NA
No	0	0.0	4	100.0			
Yes	16	15.4	88	84.6			

**Table-2: Risk factors of HDV infection (HDVAb-positive) in pregnant women**

(OR: odds-ratio; N: number; MRO: Mauritanian ouguiyas (50,000 MRO ≈170 USD); NC: not calculated; NA: not applicable)

	<b>HBsAg + or HBcAb +</b>		<b>HBsAg - and HBcAb -</b>		<b>P</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>
	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>			
<b>Age group (quartiles)</b>					<b>&lt;0.001</b>		
Less than or equal to 25 years	144	61.5	90	38.5		reference	
26 – 35 years	163	77.6	47	22.4		<b>2.17 (1.43 – 3.29)</b>	<b>&lt;0.001</b>
36 – 42 years	187	85.4	32	14.6		<b>3.65 (2.31 – 5.78)</b>	<b>&lt;0.001</b>
43 years or greater	173	82.8	36	17.2		<b>3.00 (1.92 – 4.69)</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Gender</b>					0.076		
Females	371	74.2	129	25.8			
Males	296	79.6	76	20.4		1.35 (0.98 – 1.87)	0.065
<b>Educational level: secondary or higher</b>					0.048		
No	338	80.7	81	19.3			
Yes	236	74.4	81	25.6		<b>0.70 (0.49 – 0.99)</b>	<b>0.044</b>
<b>Matrimonial status</b>					0.001		
Never married	37	64.9	20	35.1		reference	
Married once	251	84.5	46	15.5		<b>2.95 (1.57 – 5.53)</b>	<b>0.001</b>
Married more than once	174	84.5	32	15.5		<b>2.94 (1.51 – 5.70)</b>	<b>0.001</b>
<b>Polygamy</b>					0.007		
No	433	77.0	129	23.0			
Yes	62	91.2	6	8.8		<b>3.08 (1.30 – 7.28)</b>	<b>0.010</b>
<b>Age at first marriage (median)</b>					0.084		
≤ 20 years	200	81.3	46	18.7			
> 20 years	209	87.1	31	12.9		1.55 (0.95 – 2.54)	0.082
<b>Number of children (median)</b>					0.25		
0 – 3	233	80.9	55	19.1			
> 3	210	85.0	37	15.0		1.34 (0.85 – 2.12)	0.21
<b>Monthly family income</b>					0.023		
Less than or equal to 50,000 MRO	466	76.5	143	23.5			
Greater than 50,000 MRO	72	87.8	10	12.2		<b>2.21 (1.11 – 4.39)</b>	<b>0.024</b>
<b>Ethnic group</b>					0.38		
White Moor	319	77.2	94	22.8		reference	
Black Moor	154	81.1	36	18.9		1.26 (0.82 – 1.94)	0.29
Other African ethnic groups	98	74.8	33	25.2		0.88 (0.55 – 1.38)	0.57
<b>Area of residence</b>					0.53		
Coastline	371	76.7	113	23.3		reference	
River	64	82.1	14	17.9		1.39 (0.75 – 2.58)	0.29
Desert	90	78.9	24	21.1		1.14 (0.70 – 1.88)	0.60
<b>Urban residence</b>					0.14		
No	31	88.6	4	11.4			
Yes	539	77.4	157	22.6		0.44 (0.15 – 1.27)	0.13
<b>Profession</b>					0.002		
All workers	238	76.5	73	23.5		reference	
Student	34	60.7	22	39.3		<b>0.47 (0.26 – 0.86)</b>	<b>0.014</b>
Unemployed	242	82.0	53	18.0		1.40 (0.94 – 2.08)	0.096
<b>Exposure</b>					0.047		
Blood transfusion							
No	487	76.2	152	23.8			
Yes	68	86.1	11	13.9		1.93 (0.99 – 3.74)	0.052
At least one parenteral exposure except blood transfusion					1.00		
No	68	77.3	20	22.7			
Yes	487	77.3	143	22.7		1.00 (0.59 – 1.71)	1

**Table 3: Risk factors of HBV infection (HBsAg or HBcAb-positive) in patients**  
(OR: odds-ratio; N: number; MRO: Mauritanian ouguiyas (50,000 MRO ≈170 USD);  
NC: not calculated; NA: not applicable)

	<b>HDVAb +</b>		<b>HDVAb -</b>		<b>P</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>
	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>			
<b>Age group (quartiles)</b>					<i>0.11</i>		
Less than or equal to 26 years	4	9.3	39	90.7		<i>reference</i>	
27 – 36 years	6	15.8	32	84.2		<i>1.83 (0.48 – 7.04)</i>	<i>0.38</i>
37 – 43 years	10	22.7	34	77.3		<i>2.87 (0.82 – 9.98)</i>	<i>0.098</i>
44 years or greater	11	29.7	26	70.3		<b>4.13 (1.19 – 14.36)</b>	<b>0.026</b>
<b>Gender</b>					<i>0.001</i>		
Females	5	7.4	63	92.6			
Males	26	27.7	68	72.3		<b>4.82 (1.74 – 13.32)</b>	<b>0.002</b>
<b>Educational level: secondary or higher</b>					<i>0.53</i>		
No	18	22.2	71	77.8			
Yes	10	15.4	55	84.6		<i>0.72 (0.31 – 1.68)</i>	<i>0.44</i>
<b>Matrimonial status</b>					<i>0.21</i>		
Never married	1	9.1	10	90.9		<i>reference</i>	
Married once	12	16.9	59	85.1		<i>2.03 (0.24 – 17.41)</i>	<i>0.52</i>
Married more than once	12	28.6	30	71.4		<i>4.00 (0.46 – 34.75)</i>	<i>0.21</i>
<b>Polygamy</b>					<i>0.48</i>		
No	24	19.5	99	80.5			
Yes	4	28.6	10	71.4		<i>1.65 (0.48 – 5.72)</i>	<i>0.43</i>
<b>Age at first marriage (median)</b>					<i>0.23</i>		
≤ 20 years	6	15.0	34	85.0			
> 20 years	17	26.2	48	73.8		<i>2.01 (0.72 – 5.62)</i>	<i>0.19</i>
<b>Number of children (median)</b>					<i>0.36</i>		
0 – 3	12	18.5	53	81.5			
> 3	13	27.1	35	72.9		<i>1.64 (0.67 – 4.01)</i>	<i>0.28</i>
<b>Monthly family income</b>					<i>0.55</i>		
Less than or equal to 50,000 MRO	23	18.7	100	81.3			
Greater than 50,000 MRO	5	25.0	15	75.0		<i>1.45 (0.48 – 4.39)</i>	<i>0.51</i>
<b>Ethnic group</b>					<i>0.37</i>		
White Moor	21	21.2	78	78.8		<i>reference</i>	
Black Moor	7	18.4	31	81.6		<i>0.84 (0.32 – 2.17)</i>	<i>0.72</i>
Other African ethnic groups	1	6.3	15	93.7		<i>0.25 (0.03 – 1.98)</i>	<i>0.19</i>
<b>Area of residence</b>					<i>0.032</i>		
Coastline	15	15.8	80	84.2		<i>reference</i>	
River	2	8.7	21	91.3		<i>0.51 (0.11 – 2.40)</i>	<i>0.39</i>
Desert	10	34.5	19	65.5		<b>2.81 (1.09 – 7.21)</b>	<b>0.032</b>
<b>Urban residence</b>					<i>1.00</i>		
No	1	12.5	7	87.5			
Yes	27	18.6	118	81.4		<i>1.60 (0.19 – 13.57)</i>	<i>0.67</i>
<b>Profession</b>					<i>0.11</i>		
All workers	17	24.6	52	75.4		<i>reference</i>	
Student	1	10.0	9	90.0		<i>0.34 (0.04 – 2.88)</i>	<i>0.32</i>
Unemployed	6	10.9	49	89.1		<i>0.38 (0.14 – 1.03)</i>	<i>0.056</i>
<b>Exposure</b>					<i>0.40</i>		
Blood transfusion							
No	23	22.1	104	77.9			
Yes	3	30.0	7	70.0		<i>1.94 (0.47 – 8.07)</i>	<i>0.36</i>
At least one parenteral exposure except blood transfusion					<i>1.00</i>		
No	2	14.3	12	85.7			
Yes	24	19.5	99	80.5		<i>1.46 (0.31 – 6.94)</i>	<i>0.64</i>

**Table 4-a: Risk factors of HDV infection (HDVAb-positive) in patients**  
(OR: odds-ratio; N: number; MRO: Mauritanian ouguiyas (50,000 MRO ≈170 USD);  
NC: not calculated; NA: not applicable)

	OR (95% CI)	P
<i>Gender (male vs. female)</i>	4.21 (1.20 – 14.73)	0.025
<b><i>Age quartiles</i></b>		
≤ 26 years	1 (reference)	
27 – 36 years	4.13 (0.39 – 43.53)	0.24
37 – 43 years	6.98 (0.79 – 61.90)	0.081
≥ 44 years	18.66 ( 2.09 – 166.98)	0.009

**Table 4-b: Multivariate analysis of the parameters associated with hepatitis Delta infection for general consulting patients.**

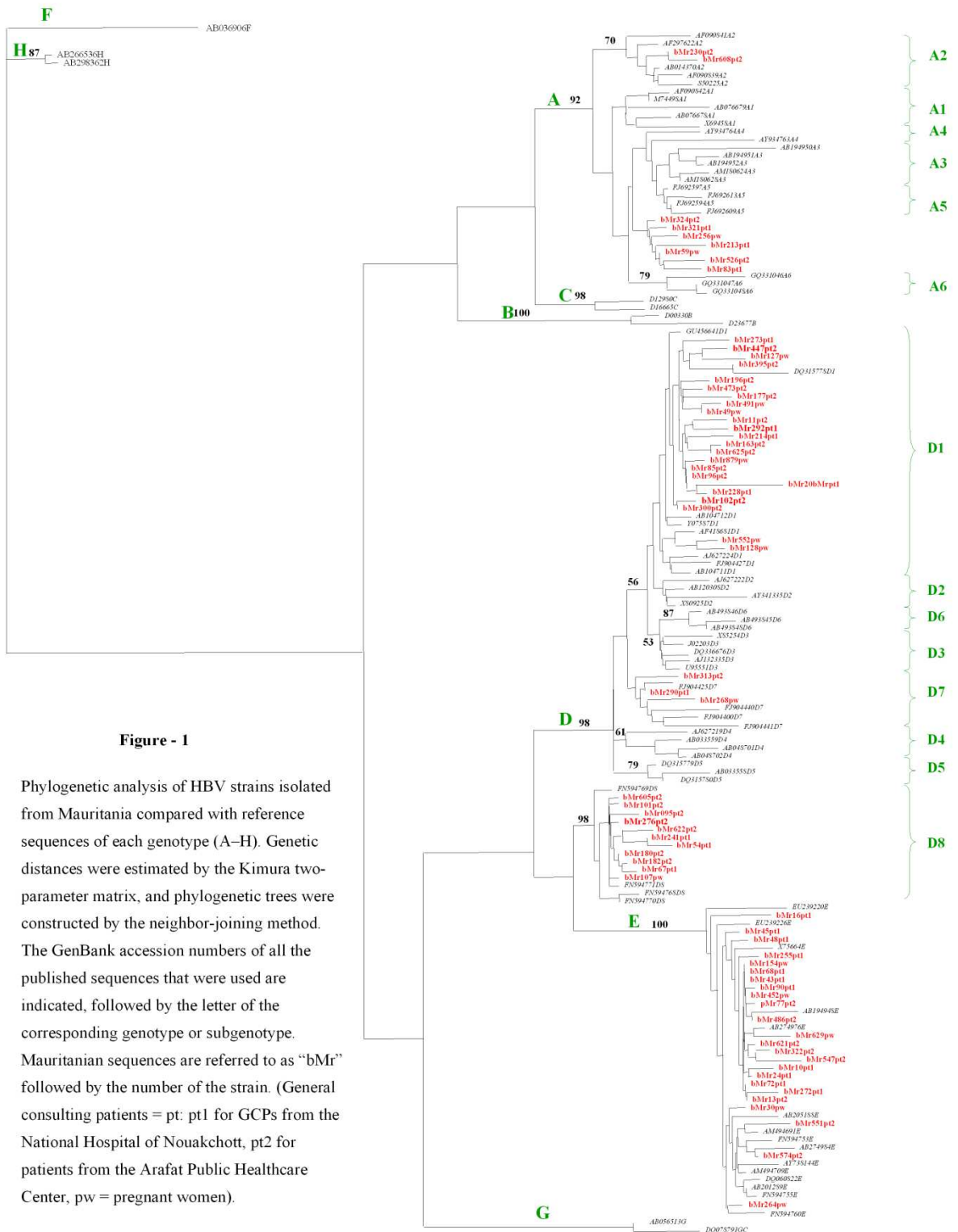
(OR: adjusted odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval)

<b>HBV-Viral load (Log IU/mL)</b>			
<i>Age groups</i>	<b>Females (Mean <math>\pm</math>SD) (N)</b>	<b>Males (Mean <math>\pm</math>SD) (N)</b>	<b>p</b>
<30	1.81 $\pm$ 1.75 (93)	2.0 $\pm$ 1.74 (35)	0.58
$\geq$ 30	1.17 $\pm$ 0.92 (90)	2.13 $\pm$ 1.51 (64)	<0.001
<b>Total</b>	<b>1.5<math>\pm</math>1.44 (183)</b>	<b>2.08<math>\pm</math>1.59 (99)</b>	<b>0.003</b>

**Table 5**

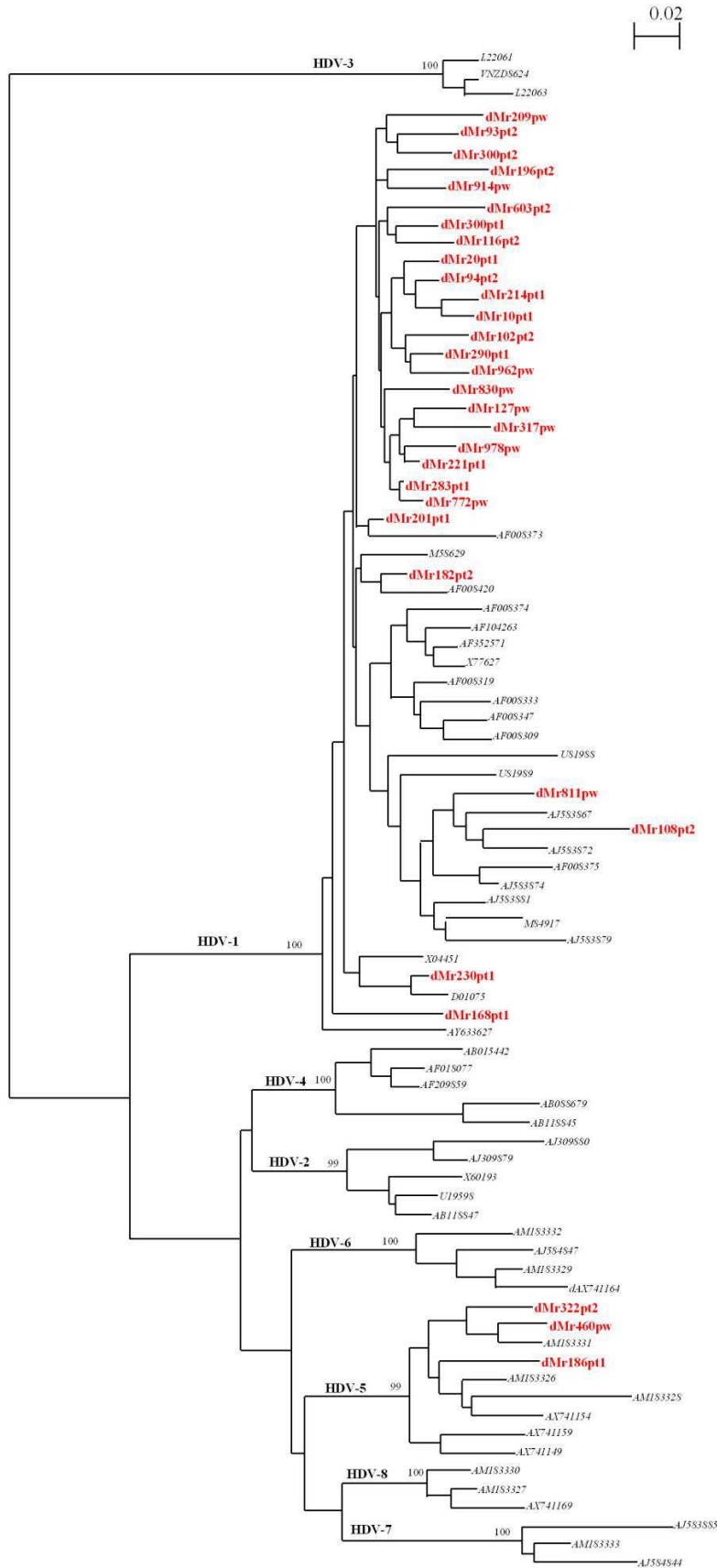
**Viral load in different age groups according to gender in the two populations**





**Figure - 1**

Phylogenetic analysis of HBV strains isolated from Mauritania compared with reference sequences of each genotype (A–H). Genetic distances were estimated by the Kimura two-parameter matrix, and phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method. The GenBank accession numbers of all the published sequences that were used are indicated, followed by the letter of the corresponding genotype or subgenotype. Mauritanian sequences are referred to as “bMr” followed by the number of the strain. (General consulting patients = pt: pt1 for GCPs from the National Hospital of Nouakchott, pt2 for patients from the Arafat Public Healthcare Center, pw = pregnant women).



**Figure 2**  
Phylogenetic tree inferred from distance analysis (Kimura 2 parameters model) and neighbor-joining reconstruction from HDV-R0 region sequences (nt 889 to 1289). Mauritanian sequences are referred to as “dMr” followed the number of the strain. (General consulting patients = pt: pt1 for GCPs from the National Hospital of Nouakchott, pt2 for patients from the Arafat Public Healthcare Center; pw = pregnant women). The 31 dMr sequences were compared to 53 reference sequences, gathering the 8 HDV genotypes

### **2.2.2 Deuxième partie : Epidémiologie moléculaire B et Delta chez les donneurs de sang**

Une étude a été conduite d'octobre 2008 à décembre 2009 en collaboration avec le Centre National de Transfusion Sanguine de Nouakchot. Les donneurs de sang (DDS) sont sélectionnés en fonction de critères assez stricts. Sont exclus du don les DDS ayant une maladie chronique, une infection sexuellement transmissible (IST) et les sujets HIV+, HCV+ et Ag HBs+.

La population d'étude a été recrutée sur la base du volontariat et après signature du consentement éclairé. Environ 11000 donneurs de sang (DDS) ont été recrutés dont 1700 étaient Ag HBs positifs. Parmi ceux-ci, 455 ont accepté de participer à l'étude. Ils ont complété un questionnaire anonyme comprenant des facteurs épidémiologiques, démographiques et les facteurs de risques d'infection par l'HBV et HDV notamment la nationalité, l'ethnie, l'âge, le métier, le niveau d'éducation, les revenus et les facteurs de risques plus particuliers comme la transfusion sanguine, le nombre de partenaires sexuels, le tatouage, piercing, circoncision, polygamie.

Les méthodes d'étude, virologiques et statistiques ont été les mêmes que celles utilisées dans l'étude du groupe précédent.

Les données recueillies ont été les suivantes : 439 hommes, 16 femmes, âge moyen  $31 \pm 8,8$ ans. Quatre vingt dix donneurs ont été retrouvés anti-Delta+ soit 19,78%. Pour les génotypes du HDV, le génotype 1 était majoritaire (88%) suivi du génotype 5. L'infection par l'HDV était associée significativement avec l'âge, le nombre de mariages, la profession (militaire), la résidence dans le désert et une histoire d'hospitalisation. Cette étude confirme la forte prévalence de l'infection HBV (15,9%) et HDV (19,78%) en Mauritanie y compris chez les DDS. Dans cet article, nous n'avons pas décrit la diversité génétique des souches HBV

mais nous avons trouvé également, la même répartition génotypique que dans les autres populations étudiées (/D dans 48,9% ; /E dans 35,6% ; HBV/A 15,6%) (Figure-2).

Cette étude a été soumise à la revue *Journal of Clinical Virology* sous le numéro **JCV-S-12-00035-1**.

## **Virological and epidemiological features of Hepatitis Delta Infection among Blood Donors in Nouakchott, Mauritania**

Wael Mansour <sup>1,2</sup>, Mohamed-Abdellahi Bollahi <sup>3,†</sup>, Cheikh-Tijani Hamed <sup>3,†</sup>, Ségolène Brichler <sup>4</sup>, Frédéric Le Gal <sup>4</sup>, Alexandra Ducancelle <sup>1,2</sup>, Baidy Lô <sup>5</sup>, Emmanuel Gordien <sup>4</sup>, Michel Rosenheim <sup>6</sup> and Françoise Lunel <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Virologie, CHU Angers; 4, rue Larrey 49933, Angers Cedex 9, France

<sup>2</sup> Laboratoire HIFIH, UPRES EA3859, Faculté de Médecine d'Angers; 1, rue Haute de Reculée 49045 Angers France.

<sup>3</sup> Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS), BP 3239, Nouakchott, Mauritania

<sup>4</sup> Laboratoire de Bactériologie, Virologie, Hygiène, associé au CNR des hépatites B, C et Delta, Hôpitaux universitaires de Paris Seine Saint Denis, site Avicenne; Université Paris 13; 125, boulevard de Stalingrad 93009 Bobigny Cedex, France

<sup>5</sup> Institut National de recherche en santé publique (INRSP); Avenue Jamal Abel Nasser, BP: 695 Nouakchott, Mauritania.

<sup>6</sup> Université Pierre et Marie Curie, Paris, France et service de Santé Publique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière; 47-83, boulevard de l'Hôpital 75651 Paris Cedex 13, France.

† These authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author: Pr. Françoise Lunel

**Mailing address:** Laboratoire de virologie, Département de biologie des agents infectieux et pharmaco-toxicologie, CHU d'Angers, 4, rue Larrey, 49933 ANGERS Cedex 9

**Phone number:** +33 2 41 35 47 09

**Fax number:** +33 2 41 35 41 64

**E-mail address:** [FrLunel-Fabiani@chu-angers.fr](mailto:FrLunel-Fabiani@chu-angers.fr)

## **ABSTRACT**

**Background:** In Mauritania, some authors have described a possible high prevalence of hepatitis Delta virus (HDV) infection in the 1990s in studies of small-size samples.

**Objectives :** The aims of our study were to assess the prevalence of HDV in HBsAg positive blood donors in Mauritania, to identify the main risk factors for HDV transmission and to analyze genetic diversity of HDV strains.

**Study design:** From October 2008 to December 2009, 11,100 consecutive blood donors were considered in this study. Among them, 1,700 (15.3%) were HBsAg positive. Four hundred and fifty five donors accepted to participate in this study. Demographic, epidemiological, ethnical, clinical and biological data were recorded. HDV screening, i.e for HDV antibodies (Ab) and RNA, and HDV genotypes, were performed for all of them.

**Results:** Ninety /455 (19.78%) donors were HDVAb positive and HDV-RNA was detectable in 56 (62.2%) of them. HDV infection was significantly associated with older age, number of marriages, military profession, residence in the desert and a history of hospitalization. The HDV genotypes of the circulating strains were HDV-1 (89.3%) and HDV-5 (10.7%).

**Conclusion:** HDV is highly endemic in Mauritanian blood donors indicating that a high number of them will develop chronic hepatitis, cirrhosis or hepatocellular carcinoma.

Associated risk factors support nosocomial transmission of HDV. These data underline the need to reinforce HBV vaccination in newborns and in blood donors without HBV markers, together with screening for HDV in HBV-infected individuals.

**Key words:** HBV, HDV, blood donors, epidemiology, HDV genotypes, Mauritania

## Article

### Background

Hepatitis B virus (HBV) infection is a serious worldwide healthcare problem,<sup>1</sup> especially in Africa. It is a major cause of morbidity and mortality due to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Prevalence of HBV serological markers is very high (up to 90%) in sub-Saharan Africa, while hepatitis B surface antigen (HBsAg) carriers vary substantially from 7% to 35% according to different regions.<sup>2</sup> Studies in Mauritanian blood donors in the recent years, have shown a high prevalence - up to 16% -of HBsAg. Despite the implementation of HBV vaccination in young children and newborns since the year 2000, Mauritania remains a hyper-endemic area for hepatitis B virus infection with a prevalence of about 15-20%, as we found in a previous study.<sup>3</sup>

Hepatitis delta virus (HDV), a satellite virus of HBV,<sup>4,5</sup> is endemic in several regions of the world, in particular in several African countries.<sup>6</sup> Five to 20% of HBV infected patients are thought to be also infected with HDV, which accounts for more severe acute or chronic liver disease and a more rapid progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma.<sup>7,8</sup> Moreover, HDV infection is difficult to treat.<sup>7,9,10</sup> HBV and HDV are transmitted parenterally via infected blood or body fluids. There is also evidence for sexual transmission and people with high-risk sexual activity are at increased risk of HDV infection.<sup>11,12</sup> Intrafamilial transmission occurs, mainly in regions of high prevalence and seems to be common.<sup>13,14</sup> Similarly, HBV and HDV are characterized by high genetic variability in 8 genotypes both, A to H and 1 to 8, respectively.<sup>15-18</sup> In the 1990s, several studies raised the possibility of a high prevalence of HDV infection in Mauritania.<sup>19,20</sup> Since this period, no study has been performed. Under the aegis of the French National Agency for Research on AIDS and viral hepatitis (ANRS), we performed a large-scale study among blood donors in Nouakchott, the capital of Mauritania.

In the National Center of Blood Transfusion of Nouakchott (CNTS), blood donors are screened for HBsAg, human immunodeficiency syndrome virus antibodies (HIV Ab), hepatitis C virus antibodies (HCVAb) but not for HDV antibodies (HDVAb).

## **Objectives**

The aim of our study was to assess the prevalence of HDVAb in HBsAg positive blood donors and to analyze the risk factors for HDVAb carriage. We also studied HDV genetic diversity of the strains spreading in Mauritanian blood donors.

## **Study design**

### **Subjects:**

From October 2008 to December 2009, all HBsAg positive blood donors were prospectively enrolled in this study. Donations were obtained mainly at a fixed site at CNTS headquarters (9768 donors, 88%), and the remaining (1342 donors, 12%) at mobile collection sites. The current national blood donation criteria include: age between 18 and 65 years, body weight above 50 kg, and good physical and mental health. Persons with chronic illnesses, women currently breast-feeding, subjects who were vaccinated within the three weeks before donation and persons at risk of sexually transmitted diseases are excluded from donation. Donor selection is performed at the blood center by physicians or medical doctors. One thousand and seven hundred out of the 11,100 consecutive donations (15.3%) were HBsAg positive. Four hundred and fifty five donors gave their informed consent to participate in this study. Subjects who were HIV Ab or HCVAb positive were excluded. The donors anonymously completed a standardized questionnaire on socio-demographic characteristics, history of parenteral exposure during medical procedures or community procedures (tattooing, piercing, circumcision, excision).

### **Serological analyses:**



After completion of the questionnaire, 2 aliquots of blood sample (5-10 ml) were collected from the donors. Samples were then centrifuged at 3000 rpm for 10 mn. Sera were tested for Hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the CNTS in Mauritania, using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (AxSYM- ABBOTT, Rungis, France). All sera were stored at -80°C and later sent by a specialized company to the virology laboratory in the Angers University Hospital in France, where they were kept at -80°C until use. HBsAg positivity was confirmed by neutralization in all samples included in this study (AxSYM- ABBOTT, Rungis, France). Total HDVAb were detected with ETI-AB-DELTA-2 (DiaSorin S. A, Antony, France).

### **Molecular analyses:**

Molecular tests including HBV-DNA and HDV-RNA detection and genotyping were performed in France in the university virology hospitals of Angers and Bobigny.

HBV-DNA and HDV-RNA extraction were carried out using the NucliSENS Easy Mag platform (BioMerieux Boxtel, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions from 300 µL of plasma or serum.

HBV-DNA was measured by a quantitative assay on the NucliSENS EasyQ platform (BioMerieux- Boxtel, The Netherlands) according to the manufacturer's conditions.<sup>21</sup>

HDV-RNA was detected by PCR using the "R0 region" (400 nt) as described by Ivaniushina et al.<sup>22</sup> HDV genotypes were determined by phylogenetic analysis of the R0 amplicon sequences, exactly as described previously.<sup>16</sup>

### **Statistical Analysis**

Student's t test was used for comparisons between HDVAb positive and negative blood donors for continuous variables, and Pearson's chi-square or Fisher's exact test for categorical variables.

Variables linked to HDV status with a P value of 0.10 or less in univariate analysis were included in a multivariate logistic regression model with a stepwise backward procedure.

Coefficients were calculated using the maximum likelihood method.

All statistic calculations were performed using SPSS software, release 19 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

## RESULTS

### Demographics and serological results

The prevalence of HBsAg was 15.3% (95% confidence interval [95%CI]: 14.63%-15.97%) During the study period (14 months), 455 HBsAg positive subjects were enrolled in the study: HDV serology was not conclusive for 8 of them, who were excluded from the study. Among the remaining 447 subjects, 431 were males and 16 females (sex ratio 27). The mean age was 31.3 years (standard deviation [SD]  $\pm$ 8.86 years, range 18-63 years). One hundred and ninety-six out of 441 (44.40%) had never been married. The most frequent occupation was that of military staff (98/447, 22%).

HDVAb was detected in 90 out of 447 HBsAg positive blood donors (20.1%; 95% CI: 16.4%-23.8%). The mean age was significantly higher in these 90 HDVAb positive donors (34.28 years,  $\pm$ 9.18 vs. 30.52 years  $\pm$ 8.63,  $P=0.001$ ). When ages were grouped according to terciles, this rate was 12.5% in subjects aged 18-25 years (first tercile) and 27.1% in subjects aged more than 33 years (third tercile).

Risk factors for HDV infection are given in table 1. The prevalence of HDVAb was significantly higher in subjects married once ( $P=0.029$ , OR=1.84, 95% CI=1.06-3.18) or in subjects married more than once ( $P<0.001$ , OR=3.48, 95% CI=3.18-6.58) as compared to subjects never married.

The presence of at least one risk of parenteral exposure to HDV (tattooing, piercing, circumcision, excision, injection with a glass syringe, nosocomial infection, anti-bilharziosis or anti-tuberculosis treatment) apart from hospitalization, was not linked to the presence of HDVAb ( $P=0.198$ ). None of these variables (apart from hospitalization) were individually, statistically linked to the presence of HDVAb (data not shown).

HDVAb rates were significantly higher in military staff as compared with other occupations (state employee, shopkeeper, farmer, breeder, worker, craftsman, private enterprise employee,

liberal professional, student, unemployed): 33.7% vs. 16.3%,  $P < 0.001$ ,  $OR = 2.6$ ,  $95\% CI = 1.57-4.31$ .

The prevalence of HDVAb was not significantly different according to ethnic group (21.5% in white Moor, 20.0% in black Moor and 14.9% in other African ethnic groups). The prevalence of HDVAb carriers was significantly higher in those living in the desert area (26.83%) as compared to those living in the coastline area or in the Senegal river area (14.51%, 19.54% respectively,  $P = 0.004$ ,  $OR = 2.16$ ,  $95\% CI : 1.27-3.67$ ). The results of multivariate analysis are shown in Table 2. The area of residence (the desert), a history of hospitalization, the number of marriages, and military profession were associated with the presence of HDVAb. The association with age group (third tercile:  $> 33$  years) was no longer found in the multivariate analysis.

### **Molecular analyses**

HBV-DNA was quantified in 378 HBsAg positive sera. The mean viral load was  $2.0 \pm 1.65$  log IU/mL. Sixty seven of them (17.7%) had an HBV-DNA viral load  $> 3.3$  log IU/mL (2000 IU/mL), and 37 (9.8%) were above 4.3 log UI/ml (20 000 UI/mL). As expected, HBV-DNA level was significantly more elevated in HDVAb negative donors ( $2.55 \pm 1.72$  vs  $1.52 \pm 1.35$  in HDVAb positive ones,  $P = 0.001$ ).

HDV-RNA was detected in 56 (62.2%) of the 90 HDVAb positive subjects. No risk factor was correlated with the detection of HDV-RNA in HDVAb positive subjects .

HDV genotyping was successful in 28 samples. HDV-1 was the main genotype (89.3 %, 25/28). HDV-5, which was originally described in Sub-Saharan African patients,<sup>16,17,23</sup> was found in 10.7% (3/28) of cases and exclusively in Black Moor and other African black ethnic groups. (Figure-1)

## DISCUSSION

A high prevalence of HBsAg in blood donors has been described in several western African countries: 8.65% in Ivory Coast,<sup>24</sup> 13.9% in Mali,<sup>25</sup> 14.3% in Burkina Faso,<sup>26</sup> 15% in Ghana,<sup>27</sup> 15.7% in Senegal,<sup>28</sup> and 18.6% in Nigeria.<sup>29</sup> However, there are few studies on the prevalence of HDVAb in HBsAg positive subjects in Sub-Saharan Africa. In Senegal, the prevalence of HDVAb among asymptomatic HBsAg-positive subjects ranged from 4% in the north to 13% in Dakar and 44% in Pikine.<sup>30</sup> HDV has also been shown to be endemic in pregnant women in Central and West Africa (from 10% in Cameroon to 15.6% in Gabon).<sup>31</sup> To our knowledge, there has been no study on the prevalence of HDV in Sub-Saharan African blood donors.

In the present study, HDVAb is found in 20% of HBsAg positive blood donors. About 62% of them were viremic at the time of donation, meaning that 38% have very low levels of HDV-RNA or have cleared the virus. We could not further address these latter issues, because the alanine aminotransferase (ALT) is not performed routinely in Nouakchott CNTS and little or no clinical data are available for these donors.

The characteristics of the HDVAb positive subjects strongly suggest healthcare-associated transmission, intra-familial transmission and perhaps sexual transmission.<sup>11-13</sup> Moreover, HDVAb positive subjects had more frequently a history of hospitalization, strongly suggested a transmission through iatrogenic, medical, or paramedical procedures. Multivariate analysis did not reveal age to be a risk factor because matrimonial status was a confounding factor. HDVAb were more frequent in subjects who had been married more than once. This indicates that intra-familial transmission (due to sharing of facilities and overcrowding) is probably an important source of HDV transmission. Similarly, the association with residence in desert areas suggests that transmission could also have been associated with healthcare, as medical doctors who administered medical care in the desert report that people living in this area are

more likely to ask for injections instead of oral tablets (they feel that injections are more effective). Moreover, mass vaccination campaigns and mass treatment of endemic non-venereal treponematoses were also common in this part of the country in the seventies. Subjects who were performing military service or who were military staff were more likely to be infected by HDV. Many hypotheses may explain the high prevalence found in this population. First, almost all are males and the sexual transmission may be more frequent and, second, these subjects may have been exposed to health care procedures more often (i.e. vaccination, parenteral antibiotic treatments etc.). Moreover, these subjects are generally living in communities, and HBV/HDV transmission may thus occur more frequently. Although all the blood donors were apparently healthy, given that they had been selected by a physician, 15.3% of them were HBsAg positive, and among them, 20% were HDV Ab positive. These results indicate that a high number of these donors will develop severe chronic hepatitis, cirrhosis, and even for some of them, hepatocellular carcinoma.<sup>7,32</sup> Therefore the management of these apparently healthy individuals is essential.

In conclusion, HBV and HDV are highly endemic in Mauritanian blood donors and represent a serious public healthcare problem. The establishment of a broad public health policy, including the vaccination of newborns and blood donors with no markers of HBV infection seems crucial.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported and financed by the French National Agency for Research on AIDS and viral hepatitis (ANRS).

We thank Abbott, Diasorin and BioMerieux for their assistance.

We also express our thanks to all those who helped us carry out our study in the National Transfusion Center of Nouakchott (CNTS) in Nouakchott, in particularly; Ahmed Ebaya, Amadou Sow and Meida Cheikh. We also thank the embassy of France in Nouakchott and particularly; Michel Treutenaere.

**CONFLICT OF INTEREST:** No conflict of interest to declare

**ETHICAL APPROVAL:** The Ethics Committee of the Mauritanian Public Health Ministry approved this study. NO. 00000865.

## REFERENCES

1. WHO. Hepatitis B vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2004;79,255-63.
2. Kramvis A, Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatol Res* 2007;37,S9-S19.
3. Mansour W, Fall-Malick Z, Sidiya A, Elkhilil I, Abdou Chekaraou M, Lô B, et al. High Prevalence of Hepatitis Delta Virus in Adults and Pregnant Women in Mauritania. Istanbul, Turkey: Monothematic conference "Hepatitis delta" European Association For the Study of the liver (EASL); 2010. Poster,A61.
4. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77,6124-8.
5. Taylor JM. Structure and replication of hepatitis delta virus RNA. *Current topics in microbiology and immunology* 2006;307,1-23.
6. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *Lancet* 2011;378,73-85.
7. Farci P. Delta hepatitis: an update. *J Hepatol* 2003;39,S212-9.
8. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7,31-40.
9. Mansour W, Ducancelle A, Le Gal F, Le Guillou-Guillemette H, Abgueguen P, Pivert A, et al. Resolution of chronic hepatitis Delta after 1 year of combined therapy with pegylated interferon, tenofovir and emtricitabine. *J Clin Virol* 2010;47,97-9.
10. Yurdaydin C, Idilman R, Bozkaya H, Bozdayi AM. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. *J Viral Hepat* 2010;17,749-56.
11. Wu JC, Chen CM, Sheen IJ, Lee SD, Tzeng HM, Choo KB. Evidence of transmission of hepatitis D virus to spouses from sequence analysis of the viral genome. *Hepatology* 1995;22,1656-60.
12. Rosenblum L, Darrow W, Witte J, Cohen J, French J, Gill PS, et al. Sexual practices in the transmission of hepatitis B virus and prevalence of hepatitis delta virus infection in female prostitutes in the United States. *JAMA* 1992;267,2477-81.
13. Niro GA, Casey JL, Gravinese E, Garrubba M, Conoscitore P, Sagnelli E, et al. Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence. *J Hepatol* 1999;30,564-9.
14. Cross TJ, Rizzi P, Horner M, Jolly A, Hussain MJ, Smith HM, et al. The increasing prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in South London. *J Med Virol* 2008;80,277-82.
15. Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 2005;23,2409-23.
16. Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anais P, Drugan T, et al. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *J Virol* 2004;78,2537-44.
17. Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis* 2006;12,1447-50.
18. Allain JP. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. *J Clin Virol* 2006;36,S12-7.
19. Tognarelli B, Coste J, Pradines C, Larrey D, Michel H. Prevalence of hepatitis delta virus among asymptomatic HBs+ antigen blood donors and in HBs+ antigen hepatopathies in Mauritania. *Gastroenterol Clin Biol* 1994;18,176.
20. Rui WZ, Lo Baidy B, N'Diaye M. Hepatitis B virus infection in the school milieu of Kiffa and Selibaby, Mauritania. *Bull Soc Pathol Exot* 1998;91,247-8.



21. Deiman B, Jay C, Zintilini C, Vermeer S, van Strijp D, Venema F, et al. Efficient amplification with NASBA of hepatitis B virus, herpes simplex virus and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* DNA. *J Virol Methods* 2008;151,283-93.
22. Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi M, et al. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol* 2001;82,2709-18.
23. Foupouapouognigni Y, Noah DN, Sartre MT, Njouom R. High prevalence and predominance of hepatitis delta virus genotype 1 infection in Cameroon. *J Clin Microbiol* 2011;49,1162-4.
24. Ouattara H, Siransy-Bogui L, Fretz C, Diane KM, Konate S, Koidio A, et al. Residual risk of HIV, HVB and HCV transmission by blood transfusion between 2002 and 2004 at the Abidjan National Blood Transfusion Center. *Transfus Clin Biol* 2006;13,242-5.
25. Diarra A, Kouriba B, Baby M, Murphy E, Lefrere JJ. HIV, HCV, HBV and syphilis rate of positive donations among blood donations in Mali: lower rates among volunteer blood donors. *Transfus Clin Biol* 2009;16,444-7.
26. Collenberg E, Ouedraogo T, Ganame J, Fickenscher H, Kynast-Wolf G, Becher H, et al. Seroprevalence of six different viruses among pregnant women and blood donors in rural and urban Burkina Faso: A comparative analysis. *J Med Virol* 2006;78,683-92.
27. Ampofo W, Nii-Trebi N, Ansah J, Abe K, Naito H, Aidoo S, et al. Prevalence of blood-borne infectious diseases in blood donors in Ghana. *J Clin Microbiol* 2002;40,3523-5.
28. Toure-Fall AO, Dieye TN, Sall A, Diop M, Seck M, Diop S, et al. Residual risk of transmission of HIV and HBV, in Senegalese national blood bank from 2003 to 2005. *Transfus Clin Biol* 2009;16,439-43.
29. Buseri FI, Muhibi MA, Jeremiah ZA. Sero-epidemiology of transfusion-transmissible infectious diseases among blood donors in Osogbo, south-west Nigeria. *Blood Transfus* 2009;7,293-9.
30. Roingard P, Sankale JL, Dubois F, Diouf A, Bacha A, Mboup S, et al. Infection due to hepatitis delta virus in Africa: report from Senegal and review. *Clin Infect Dis* 1992;14,510-4.
31. Makuwa M, Caron M, Souquiere S, Malonga-Mouelet G, Mahe A, Kazanji M. Prevalence and genetic diversity of hepatitis B and delta viruses in pregnant women in Gabon: molecular evidence that hepatitis delta virus clade 8 originates from and is endemic in central Africa. *J Clin Microbiol* 2008;46,754-6.
32. Grabowski J, Wedemeyer H. Hepatitis delta: immunopathogenesis and clinical challenges. *Dig Dis* 2010;28,133-8.

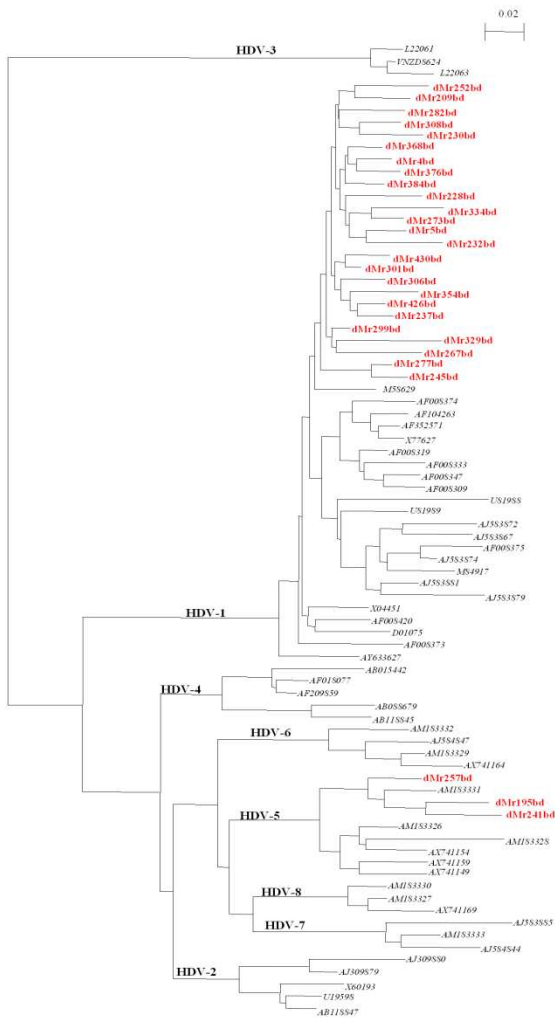


Figure-1

Phylogenetic tree inferred from Distance analysis (Kimura 2 parameters model) and Neighbor Joining reconstruction from HDV-R0 region sequences (nt 889 to 1289). Mauritanian sequences are referred to as ‘dMr’ followed the number of the strain. The “bd” referred to blood donors. The 28 dMr sequences were compared to 52 reference sequences, gathering the 8 HDV genotypes.

	HDVAb+*	HDVAb- †	crude OR (95%CI) §	P-value
	N(%)‡	N(%)‡		
<b>Sex</b>				
Female	1 (6.3%)	15 (93.8)	1 (reference)	
Male	89 (20.6%)	342 (79.4)	3;9 (0.51-29.9)	0.158
<b>Age group (terciles)</b>				
18-25 years	17 (12.5%)	119 (87.5)	1 (reference)	
26-33 years	31 (19.87%)	125 (80.13)	1.74 (0.91-3.3)	0.092
>33 years	42 (27.1%)	113 (72.9)	2.6 (1.4-4.83)	0.002
<b>Educational level: secondary or more</b>				
no	43 (21.1%)	161 (78.9)	1 (reference)	
yes	47 (19.6%)	193 (80.4)	0.91 (0.57-1.45)	0.696
<b>Matrimonial status</b>				
never married	26 (13.3%)	170 (86.7)	1 (reference)	
married once	38 (22%)	135 (78)	1.84 (1.06-3.18)	0.029
married more than once	25 (34.7%)	47 (65.3)	3.48 (1.84-6.58)	<0.001
<b>Polygamy</b>				
no	61 (25.8%)	175 (74.2)	1 (reference)	
yes	6 (19.4%)	25 (80.6)	0.69 (0.27-1.76)	0.433
<b>Age at 1<sup>st</sup> marriage (median)</b>				
<27 years	32 (26.2%)	90 (73.8)	1 (reference)	
≥27 years	29 (25.7%)	84 (74.3)	0.97 (0.54-1.74)	0.921
<b>Number of children (median)</b>				
0-2	30 (22.9%)	101 (77.1)	1 (reference)	
>2	31 (30.4%)	71 (69.6)	1.47 (0.82-2.65)	0.197
<b>Monthly family income</b>				
less than or equal to 50.000 MRO ¶	67 (20.2%)	264 (79.8)	1 (reference)	
more than 50.000 MRO	23 (20%)	92 (80)	0.99 (0.58-1.67)	0.956
<b>Ethnic group</b>				
Others African ethnic groups	7 (14.9%)	40 (85.1)	1 (reference)	
White Moor	40 (20%)	160 (80)	0.70 (0.29-1.17)	0.424
Black Moor	43 (21.5%)	157(78.5)	0.64 (0.27-1.53)	0.313
<b>Occupation</b>				
other ¶¶	57 (16.3%)	292 (83.7)	1 (reference)	
military personnel	33 (33.7%)	65 (66.3)	2.6 (1.57-4.31)	<0.001
<b>Area of residence</b>				
coastline	28 (14.5%)	165 (85.5)	1 (reference)	
river	17 (19.5%)	70 (80.5)	1.43 (0.74-2.78)	0.289
desert	44 (26.8%)	120 (73.2)	2.16 (1.27-3.67)	0.004
<b>Urban residence</b>				
no	6 (19.4%)	25 (80.6)	1 (reference)	
yes	84 (20.2%)	332 (79.8)	1.05 (0.42-2.65)	0.911
<b>Sedentary lifestyle</b>				
no	4 (26.7%)	11 (73.3)	1 (reference)	
yes	86 (19.9%)	346 (80.1)	1.46 (0.45-4.71)	0.521
<b>At least one parenteral exposure **</b>				
apart from hospitalization				
no	84 (21.1%)	314 (78.9)	1 (reference)	
yes	6 (13%)	40 (87)	0.56 (0.23-1.37)	0.198
<b>History of hospitalization</b>				
no	76 (18.6%)	333 (81.4)	1 (reference)	
yes	14 (40%)	21 (60)	2.92 (1.42-5.99)	0.002
<b>Total</b>	<b>90 (20.1%)</b>	<b>357 (79.9)</b>		

Table 1: Risk factors for HDV infection in blood donors

\* positive for hepatitis delta antibodies

† negative for hepatitis delta antibodies

‡ number (percentage)

§ odds ratio (95% confidence interval)

¶ 50.000 Mauritanian ouguiyas, more or less 180 USD

|| state employee, shopkeeper, farmer, breeder, worker, craftsman, private enterprise employee, liberal professional, student, unemployed

\*\* tattooing, piercing, circumcision, excision, injection with a glass syringe, nosocomial infection, anti-bilharziosis or anti-tuberculosis treatment

	Adjusted odds ratio (IC95%)*	P
<b>Profession</b>		
Others <sup>†</sup>	1 (reference)	
Military personnel	2.17 (1.27-3.72)	0.01
<b>Hospitalization</b>	2.67 (1.24-5.75)	0.01
<b>Area of residence</b>		
Coastline	1 (reference)	
River	1.35 (0.68-2.69)	0.39
Desert	2.04 (1.17-3.55)	0.01
<b>Matrimonial status</b>		
never married	1 (reference)	
married once	1.47 (0.73-2.95)	0.28
married more than once	2.47 (1.04-5.85)	0.04
<b>Age groups (terciles)</b>		
18-25 years	1 (reference)	
26-33 years	1.19 (0.57-2.46)	0.65
>33 years	1.16 (0.49-2.75)	0.73

TABLE 2: Multivariate analysis of the parameters associated with hepatitis delta antibodies

\* (95% confidence interval)

† state employee, shopkeeper, farmer, breeder, worker, craftsman, private enterprise employee, liberal profession, student, unemployed

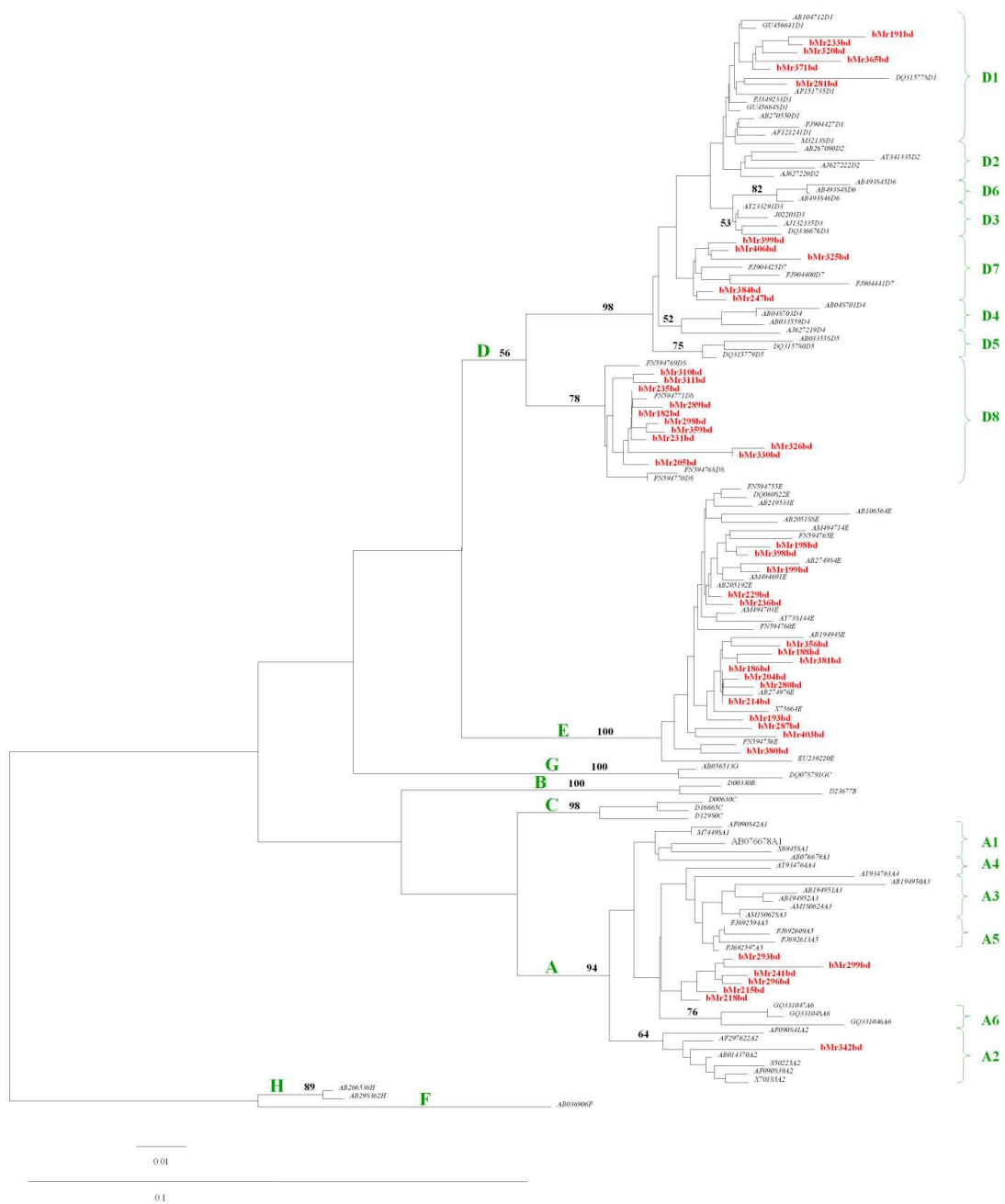


Figure 2

Phylogenetic tree inferred from Distance analysis (Kimura 2 parameters model) and Neighbor Joining reconstruction from HBV-PreS1 region sequences (nt 2817 to 80). Mauritanian sequences are referred to as 'bMr' followed the number of the strain. The "bd" referred to blood donors. The bMr sequences were compared to reference sequences, gathering the 8 HBV genotypes

## **2.3 Résultats 3 : caractérisation moléculaire des souches HBV et HDV circulant en mauritanie**

### **2.3.1 Introduction :**

L'infection par les virus des hépatites B et Delta est endémique en Afrique. La transmission se fait principalement à la naissance ou dans la petite enfance ou plus tard par transmission sexuelle ou nosocomiale. La prévalence de l'hépatite B se situe généralement aux alentours de 10% (prévalence de l'Ag HBs). En Mauritanie, on ne disposait pas d'études réalisées dans la population générale, seules quelques études partielles faisaient part d'une prévalence de l'AgHBs supérieure à 15%. En ce qui concerne les hépatites Delta, des études des années 90 semblaient montrer une prévalence élevée en Mauritanie. Il faut noter que la Mauritanie fait partie des pays ayant mis en place le programme élargi de vaccination incluant la vaccination contre l'Hépatite B à la sixième semaine de la vie, avec un taux de couverture variable suivant les régions.

Nous avons eu l'opportunité de rencontrer plusieurs équipes de médecins, de biologistes et de responsables de transfusion sanguine mauritaniens qui nous ont alerté sur la notion d'une prévalence élevée de la co-infection B-Delta en Mauritanie et sollicité pour la conduite d'études.

Dans une pré-étude de 100 patients consécutifs infectés par l'HBV vus lors de consultations à visée humanitaire, la prévalence du HDV était proche de 30 %.

Dans le cadre d'une organisation non gouvernementale (ONG), nous avons essayé d'évaluer l'impact de la co-infection par le virus Delta sur la fibrose hépatique sur une petite série de patients mauritaniens vus en consultation, recrutés entre 03 au 10 mai 2007 par élastométrie impulsionnelle. Une évaluation clinique et biologique a été aussi effectuée. 18 patients atteints d'hépatite B et 23 d'hépatite B-Delta ont pu être inclus dans l'analyse, car qui

rentrant dans les critères validant la mesure de l'élastométrie (plus de 60% de mesures concordantes). Les patients co-infectés B-Delta avaient une fibrose, évaluée par l'élastométrie, significativement plus importante que les patients mono-infectés par l'HBV. Une étude épidémiologique plus large dans les différentes populations en Mauritanie a alors été entreprise. Elle a été financée par l'ANRS en fin 2007, mais n'a pu commencer qu'en 2008 en raison de problèmes à la fois politiques et organisationnels. Les principaux objectifs de l'étude étaient de déterminer la prévalence de l'hépatite B et Delta en Mauritanie, dans diverses populations : des patients consultant à deux centres de santé publique (Hôpital National « CHN » et au centre Arafat), une population de femmes enceintes et des donneurs de sang (DDS) du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS). D'autre part, une autre étude transversale a été réalisée sur une population de 300 patients Ag HBs+ consécutifs, consultant dans le service d'Hépatogastroentérologie de l'Hôpital de Nouakchott afin d'évaluer l'impact de l'infection par l'HDV sur l'histoire naturelle de la maladie hépatique.

Aucune étude moléculaire des souches circulantes en Mauritanie n'avait jamais été effectuée auparavant. De même aucune donnée concernant l'infection HDV n'était disponible.

Ce travail a permis l'étude de la diversité génétique des hépatites B et Delta en Mauritanie.

### **2.3.2 Matériels et méthodes**

Populations d'étude :

Quatre cohortes différentes ont été testées dans cette étude (les trois premières cohortes; consultants, femmes enceintes et donneurs de sang, ont déjà été présentées dans le chapitre II des résultats) :

1. La première population était constituée de patients se rendant en consultation pour une autre cause qu'une maladie du foie. L'inclusion de cette population a été réalisée dans deux centres : le Centre Hospitalier National (CHN)( n=414), Centre de Santé Publique d'Arafat (n=532).
2. La deuxième cohorte était représentée par 1020 femmes enceintes, suivies dans un Centre de Santé Publique à Nouakchott (Sabkha) entre décembre 2008 et mars 2009.
3. La troisième population comprenait les donneurs de sang retrouvés Ag HBs+ lors du don du sang ayant accepté de participer à l'étude. Cette étude a été conduite avec la collaboration du Centre de Transfusion de Nouakchott sur 11100 donneurs de sang (DDS). Sur les 1700 DDS Ag HBs positifs 455 ont accepté de participer à l'étude.
4. La quatrième cohorte d'étude consistait en 300 patients Ag HBs (+) consécutifs suivis en consultation d'Hépatogastroentérologie de mars à Octobre 2009. L'étude avait pour but d'étudier l'impact de la surinfection par l'HDV sur la sévérité des lésions hépatiques.

Méthodes :

La recherche de l'AgHBs a été réalisée par une méthode ELISA (AxSYM Abbott) chez les femmes enceintes et chez les donneurs de sang; et par des tests rapides (Vikia, Biomérieux) au Centre Hospitalier de Nouakchott et au Centre Arafat. Ensuite, les sérums ont été congelés à -80°C pour envoi au Laboratoire de Virologie d'Angers. Tous les sérums ont été retestés à



Angers pour l'AgHBs par une technique ELISA (AxSYM Abbott). Les anticorps anti-Delta ont été recherchés avec la technique ELISA (Diasorin, Anthony, France) chez tous les sujets retrouvés Ag HBs positifs. L'ADN de l'HBV a été mesuré par la technique Nuclisens avec une limite de détection de 80 UI/ml dans notre étude car nous ne disposions que d'une faible quantité de sérum. L'ARN du virus de l'hépatite Delta a été recherché en PCR qualitative ([Ivaniushina et al., 2001](#)). Les génotypes de l'HBV et de l'HDV ont été déterminés par séquençage direct suivi par des analyses phylogénétiques d'un fragment d'ADN de 479 pb dans la région de l'HBV-pré S1 (nt 2817-80) pour l'HBV, ou la région HDV-R0 (400 nt) pour l'HDV ([Nagasaki et al., 2006](#)).

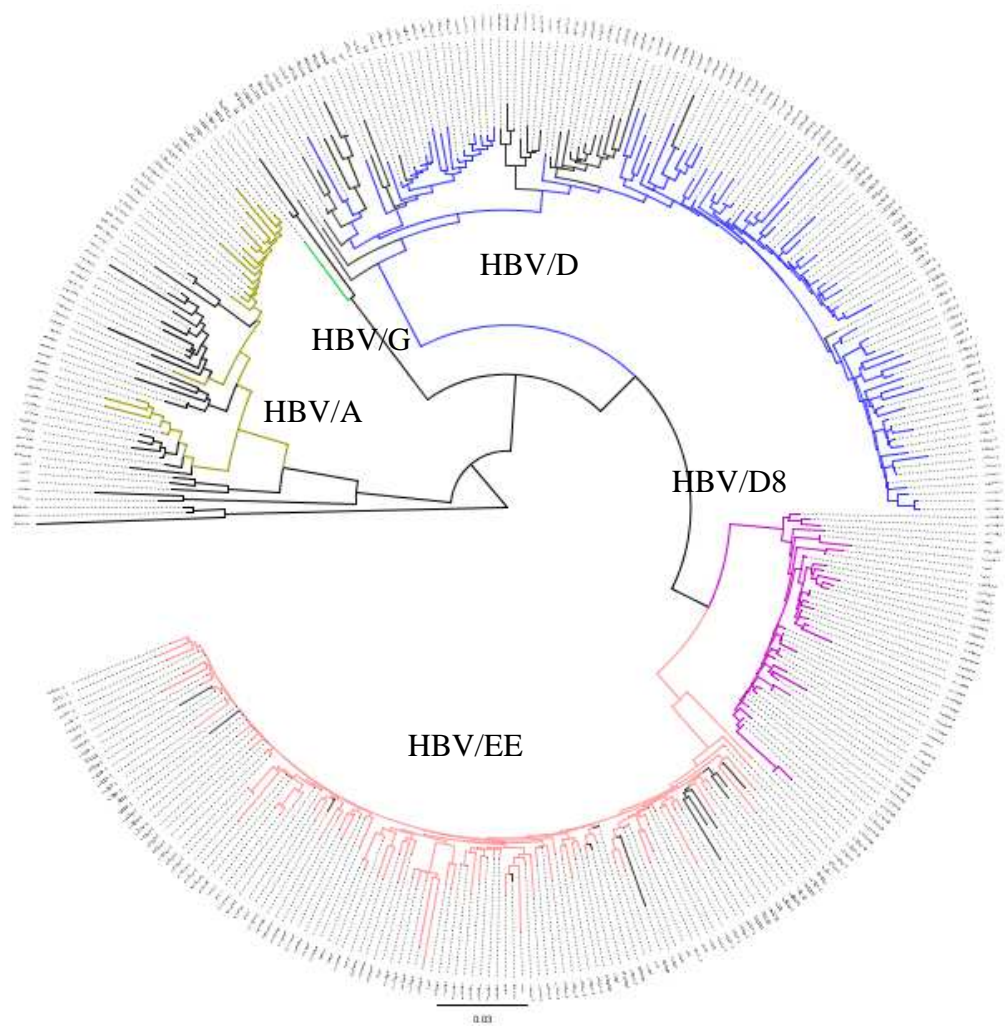
L'alignement des séquences HBV et HDV a été réalisé avec le logiciel ClustalX. Les analyses phylogénétiques incluant la distance (Kimura-2 paramètres) et la neighbor-joining method ont été effectuées en utilisant le logiciel PAUP \* 4.0b6.

### **2.3.3 Résultats et discussion :**

Dans les premières trois cohortes, 13066 sujets ont été inclus, 1982 (15.2%) d'entre eux étaient AgHBs positifs. 737 ont accepté de participer à notre étude. Parmi ces 737 sujets AgHBs+, 718 ont été testés pour l'Ac anti Delta et 137 (19.1%) ont été retrouvés porteurs d'Ac anti Delta+. Les Ac anti Delta ont été recherchés également chez les 300 patients (étude cas-cas) et 98 (33.3%) ont été retrouvés Ac anti Delta +.

#### **2.3.3.1 Caractérisation des souches HBV en Mauritanie :**

Au total, nous avons génotypé 240 souches HBV. La répartition en génotypes était : 135 HBV/D, 83 HBV/E, 21 HBV/A et 1 HBV/G. (figure-1)

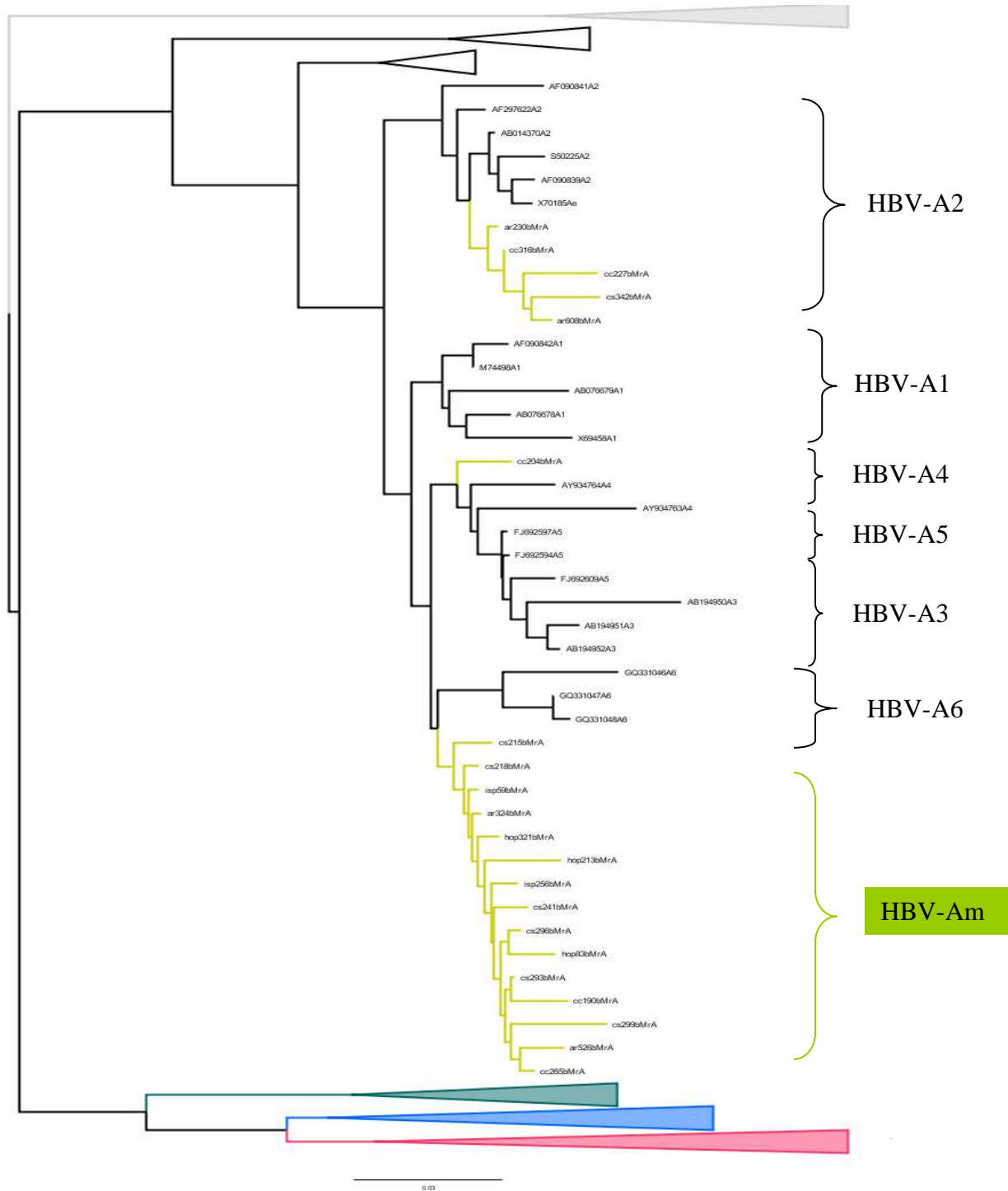


**Figure-1**

Caractérisation des souches des HBV en Mauritanie. Les souches mauritaniennes sont en couleur. Les souches de référence sont en noir.

### **2.3.3.1.1 Génotypes HBV/A (n=21) :**

Nous avons identifié 1 sous génotype A4 et 5 sous génotypes A2. En revanche, les 15 autres souches (71,43%) se regroupaient sur une branche distincte, différentes des autres sous-génotypes décrits à ce jour, formant un cluster mauritanien, désigné HBV/Am ('m' pour mauritanien) dans notre figure (Figure-2). La suite de notre travail (en cours) est donc de faire la séquence complète de toutes ces souches HBV/A mauritaniennes, avec des analyses phylogénétiques extensives afin de les caractériser. Nos travaux prendront en compte la mise en évidence récente d'un sous-génotype A7 ([Hubschen et al., 2011](#)) et la nécessité d'une nouvelle classification de ses sous-génotypes proposée par Pourkarim et collaborateurs ([Pourkarim et al., 2010](#)).



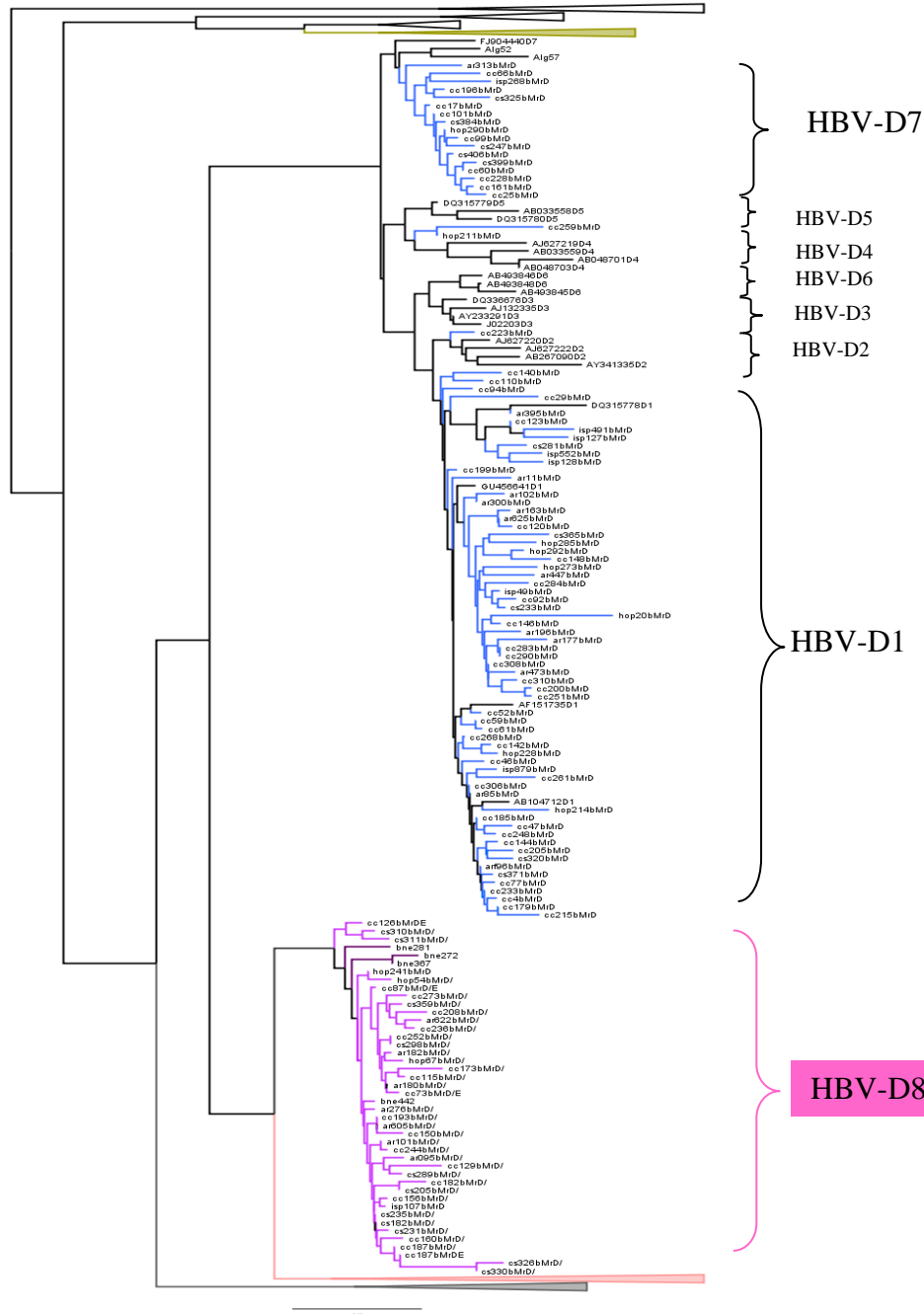
**Figure-2**

Phylogramme reconstruit à partir d'une analyse de distance-NJ par PAUP montrant la variabilité génétique au sein de HBV/A en Mauritanie. Les souches mauritaniennes sont en couleur (verte). Les souches HBV/A de référence sont en noir.

### **2.3.3.1.2 HBV/D (n=135):**

Le génotype D est majoritaire en Mauritanie, 135 sur 240 souches (56,25%). Parmi les 135 souches de génotype D, les sous-génotypes se répartissent ainsi : 70 HBV/D1 (51.9%) ; 40 HBV/D8 (29.6%) ; 17 souches HBV/D7 (12.6%), puis 2 HBV/D4 et 1 HBV/D2 (Figure-3). De façon intéressante, l'HBV/D8, que nous avons décrit pour la première fois au Niger, représente environ 30% de souches HBV/D en Mauritanie. De même l'HBV/D7, identifié, pour la première fois, par Meldal et al chez 59% des patients tunisiens ([Meldal et al., 2009](#)) représente 12.6% de souches HBV/D mauritaniennes. Les données publiées pour l'Algérie et le Maroc suggèrent aussi l'importance de ce nouveau subgénotype dans la région ([Khelifa and Thibault, 2009](#)) ([Ezzikouri et al., 2008](#)).

Nos travaux actuels (en cours) consistent en la caractérisation complète de ces souches HBV/D8, par la détermination de leur séquence complète et l'analyse des régions recombinantes, afin de les comparer aux souches nigériennes déjà caractérisées. De même plusieurs souches HBV/D7 seront aussi complètement séquencées pour comparaison avec les souches D7 publiées.



**Figure-3**

Phylogramme reconstruit à partir d'une analyse de distance-NJ par PAUP montrant la variabilité génétique au sein de HBV/D en Mauritanie. Le sousgénétype D8 (couleur violet) represent environ 30% de souches HBV/D. Les souches mauritaniennes sont en couleur (bleu sauf D8 en violet). Les souches HBV/D de référence sont en noir.

### 2.3.3.1.3 Génotype HBV/E (n=83):

Plus de 34% des séquences analysées dans cette étude appartenait au génotype E, génotype majoritaire en Afrique subsaharienne et Afrique de l’Ouest. (Figure-4). De même le séquençage du génome complet des souches HBV/E mauritaniennes de chaque cluster de l’arbre phylogénétique ci-dessous sera réalisé.

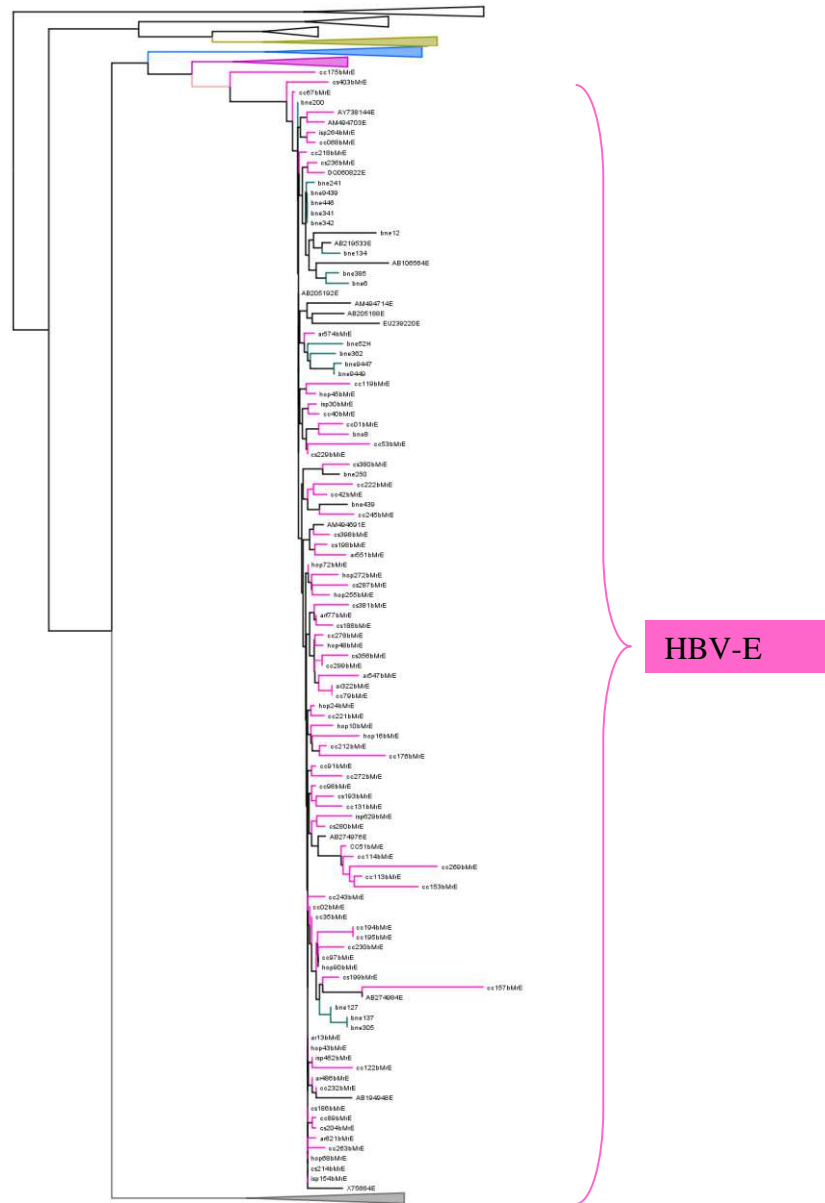


Figure-4

Phylogramme reconstruit à partir d’une analyse de distance-NJ par PAUP montrant la variabilité génétique au sein de HBV/E en Mauritanie. Les souches mauritaniennes sont en couleur rose, les souches nigériennes sont en couleur verte. Les souches de référence sont en noir.



### 2.3.3.2 Rôle de l'ethnie dans la distribution des génotypes HBV:

Comme la Mauritanie est un pays multi-ethnique, nous avons essayé de trouver une association entre les génotypes HBV et certaines ethnies. L'HBV/D a été retrouvé principalement chez les maures blancs (72.5%) alors que l'HBV/E était plus fréquent chez les maures noirs (47.5%) et dans les autres ethnies africaines (52.78%) (tableau-1).

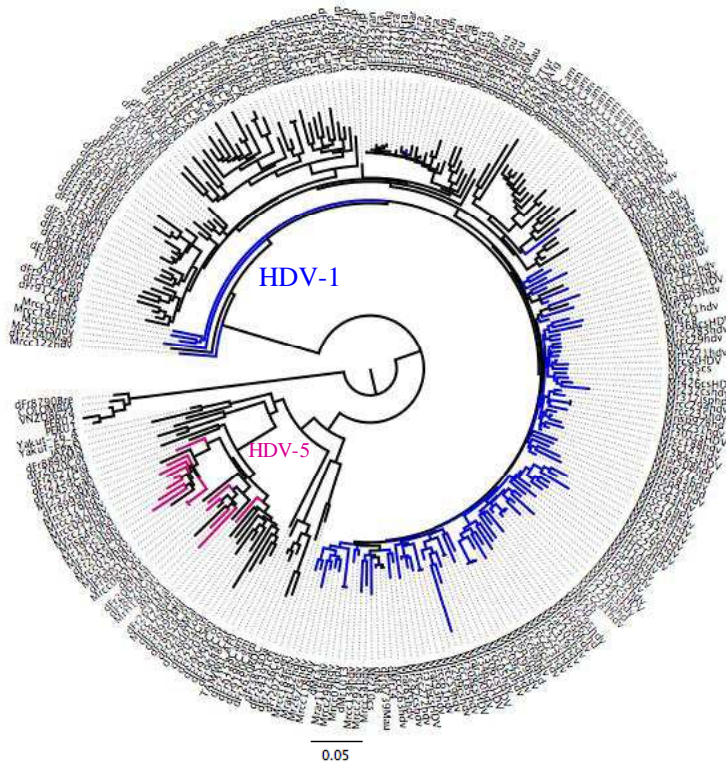
HBV/génotypes	Toutes les cohortes			
	A (n, %)	D (n, %)	E (n, %)	TOTAL
Maures blancs	8 (6,67)	87 (72,5)	25 (20,83)	120
Maures noirs	6 (7,5)	36 (45)	38 (47,5)	80
Autres	8 (22,22)	9 (25)	19 (52,78)	36
TOTAL	22 (9,32)	132 (55,93)	82 (34,75)	236

**Tableau-1**

Rôle de l'ethnie dans la distribution de HBV génotypes

### 2.3.3.3 Caractérisation des souches des HDV en Mauritanie :

La détermination du génotype HDV a été réalisée sur 134 sérums par l'analyse phylogénétique de la séquence de la région *R0* du génome HDV. Le génotype des souches caractérisées est présenté dans le Figure-5. Ainsi, parmi les 134 souches isolées, nous avons retrouvé 119 (88.81%) souches HDV-1 et 15 (11.19%) souches HDV-5.



**Figure-5**

Caractérisation des souches des HDV en Mauritanie. Les souches maritaniennes sont en couleur. Les souches de référence sont en noir.

Comme pour l'HBV, nous avons aussi analysé la répartition des génotypes selon l'ethnie. L'HDV-5 représentait environ 25% des génotypes HDV chez les maures noirs contre 5% chez les maures blancs (différence non significative). Historiquement, il faut noter que les maures noirs sont d'origine africaine subsaharienne alors que les maures blancs seraient arrivés d'Afrique de Nord (tableau-2).

HDV génotypes	Toutes les cohortes		
	HDV-1 (n, %)	HDV-5 (n, %)	TOTAL
Maures blancs	63(95,45%)	3(4,55)	66
Maures noirs	25(75,76)	8(24,24)	33
Autres	1 (33,33%)	2 (67,34%)	3
TOTAL	39	13	102

**Tableau-2**

Rôle de l'ethnie dans la distribution des génotypes HDV en Mauritanie

### **2.3.3.4 Impact clinique de l'infection Delta et la diversité génétique sur la sévérité de la maladie hépatique (étude cas-cas) :**

L'histoire naturelle d'hépatite B et le rôle aggravant de l'hépatite delta sont mal connus en Afrique. Dans le but d'évaluer l'impact de l'infection par le HDV et la diversité génétique de l'HDV et de l'HBV sur la sévérité de la maladie hépatique, nous avons réalisé une étude transversale en Mauritanie chez les porteurs chroniques de l'HBV suivi pour une maladie hépatique (étude cas-cas). Trois cents patients Ag HBs+ consécutifs, consultant dans le service d'Hépatogastroentérologie de l'Hôpital de Nouakchott (CHN), ont été inclus. Le bilan sanguin comportait : sérologie HDV, ADN HBV, ARN HDV, mesure non invasive des lésions hépatiques par FibroMètre (FM) et Actimètre (AFM). L'histoire naturelle a été évaluée grâce à la régression non linéaire de LOWESS de l'âge et des lésions hépatiques. L'absence de PBH permettait d'écarter tous les biais liés à celle-ci (sélection, échantillonnage, reproductibilité).

#### **2.3.3.4.1 Résultats préliminaires :**

1) Population globale : âge : 36±12 ans, 61.3% hommes, stades FFM Metavir : F0/1 : 25,5%, F1 : 16.2%, F1/2 : 23,1%, F2/3 : 14.8%, F3/4 : 11,4%, F4 : 9,0% ; grades AFM Metavir A0/1 : 26,4%, A1/2 : 62,0%, A2/3 : 11.5% ; Ac HDV : 33,2%.

2) Population HDV(-) vs HDV(+) : âge : 33±11 vs 41±12 ans ( $p < 10^{-3}$ ), score FibroMètre F : 0.40±0.25 vs 0.70±0.28 ( $p < 10^{-3}$ ), score Actimètre : 0.38±0.18 vs 0.57±0.22 ( $p < 10^{-3}$ ), fibrose sévère : 6,8 vs 47,4% ( $p < 10^{-3}$ ), cirrhose marquée : 4,2 vs 18,6% ( $p < 10^{-3}$ ).

3) Les génotypes de l'HBV étaient répartis comme suit :

a) Dans la population HBV (+) / HDV(-): A = 5, D= 56, E= 30.

b)- Dans la population HBV (+) / HDV(+): A= 0 , D=13, E=9.

4) Les génotypes de l'HDV étaient : HDV-1= 40, HDV-5=7.

5) Les relations entre variables démographiques et virologiques ont été analysées en analyse univariée puis multivariée. Synthèse des résultats :

a) Activité : L'hépatite B a plus d'activité en cas de co-infection HDV quelque soit l'âge. L'activité s'aggrave en fonction de l'âge uniquement en cas de co-infection HDV. Les femmes ont moins d'activité et la différence diminue peu en fonction de l'âge. L'activité est indépendamment liée à : HDV +, ASAT, sexe masculin et taux ADN HBV.

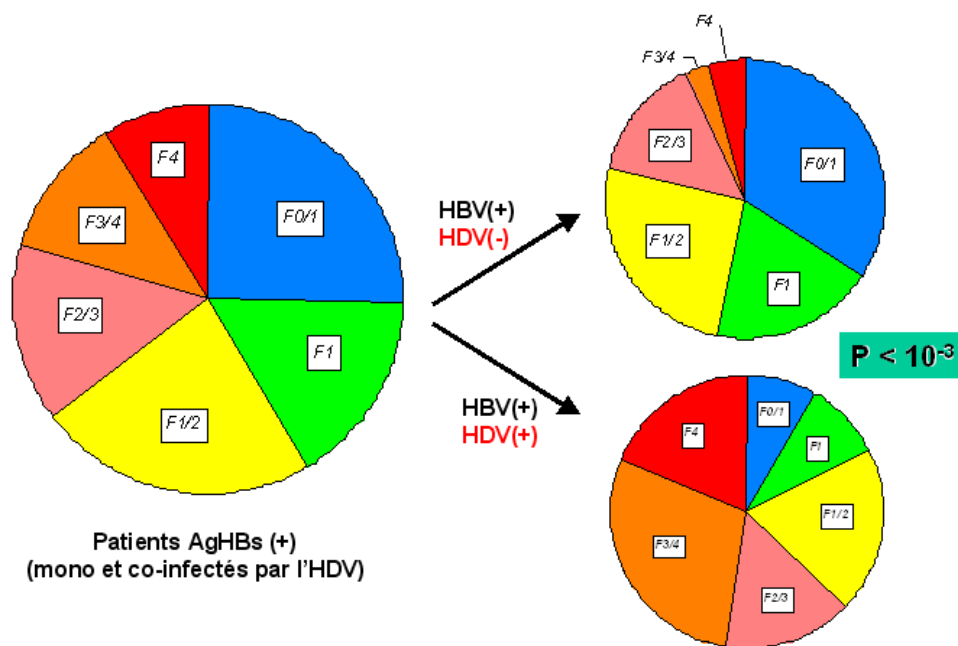
b) Fibrose : La co-infection HBV-HDV est associée à plus de fibrose quelque soit l'âge. La fibrose s'aggrave nettement en fonction de l'âge. Les femmes ont moins de fibrose mais la différence diminue fortement en fonction de l'âge. La fibrose est fortement corrélée aux transaminases quelque soit le sexe et le statut HDV. La fibrose est indépendamment liée à : l'infection Delta, le sexe masculin, l'âge, l'ALAT, le taux de l'ADN HBV et la positivité de l'ARN HDV.

En conclusion, la co-infection Hépatite Delta est fréquente en Mauritanie (1/3 des hépatites B) survient chez des sujets plus âgés (évoquant une transmission plus tardive, par exemple nosocomiale), et aggrave nettement la sévérité de l'hépatite B (activité, fibrose et cirrhose). Les analyses statistiques complémentaires, en cours de réalisation, vont permettre

de montrer le rôle de la charge virale HDV, et des génotypes HBV (surtout, sous-génotype D8) dans la sévérité de la maladie hépatique.

Les résultats préliminaires de cette enquête, en cours de rédaction, ont été présentés au congrès : EASL Monothematic Conference: Delta Hepatitis (European Association For the Study of the liver ) Turkey, Istanbul. *September 24-26, 2010.* (voir poster-1 ; page-212).

Cette étude doit être également complétée cette année par une étude chez 100 patients atteints de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire (CHC) et sera l'objet d'une publication scientifique (rédaction en cours).



**Figur-6**

Classification  $F_{FM}$  (stages de fibrose selon le FibroMètre) : comparaison populations HBV et HBV / HDV

### 2.3.3.5 Étude de la co-spéciation entre les génotypes B et delta

Dans notre étude en Mauritanie, 35 couples B-Delta ont pu être génotypés. Comme le montre le tableau 3, nous n'avons pas retrouvé l'association HDV-5 et HBV/D dans cette cohorte. Le génotype HDV-1 pouvait être associé à des souches HBV de génotype D (71%), E (25,8%) ou A (3,1%). Le génotype HDV-5 était associé aux génotypes HBV/A (25%) et HBV/E (75%).

En résumé, le génotype E pouvait s'associer aux 2 génotypes delta présents dans notre cohorte, HDV-1 et HDV-5, alors que le génotype D s'associait exclusivement au génotype HDV-1. Ces résultats sont cependant retrouvés sur un nombre limité de souches HDV-5.

Génotype HBV/HDV	HDV-1	HDV-5
HBV/A	1 (50%)	1 (50%)
HBV/D	22 (100%)	0
HBV/E	8 (72,7%)	3 (27,3%)
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>4</b>

Tableau-3  
Co-spéciation entre les génotypes B et delta

Dans une autre cohorte du CNR Delta de l'hôpital Avicenne comprenant 82 couples HBV/HDV infectant des patients originaires de la région du Sahel (Tchad, Mauritanie, Niger et Mali), 48 isolats étaient de type HDV-5, 26 isolats de type HDV-1 et 8 isolats de type HDV-7. L'HBV/E était associé à l'HDV-5 (70,37%), mais aussi à l'HDV-1 (22,22%) et à l'HDV-7 (3,7%). Cependant, l'HBV/D était associé aux génotypes HDV-1 (70%) et HDV-5 (30%).

Peut-on évoquer la possibilité d'une sélection des certains génotypes HDV par le virus « helper » lui-même ? Ou, s'agit-il de l'association entre les souches majoritaires B et D circulant dans une région donnée ? L'association entre les génotypes HDV-3 et HBV-F est prévalente dans des populations indigènes d'Amazonie ([Casey et al., 1996](#)). En Asie du Sud-

Est, les associations entre les génotypes HBV-B et -C et les génotypes HDV-2 et -4 sont retrouvées. Autour du bassin méditerranéen, le génotype HBV-D est associé au génotype HDV-1. Toutefois, 5 génotypes HDV circulent en Afrique (1, 5, 6, 7 et 8) et au moins 3 génotypes HBV (A, D, E). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour mettre en évidence une association préférentielle entre génotype B et Delta. Les bases moléculaires de cette association restent à être élucidées.

### **3 DISCUSSION GENERALE- CONCLUSION - PERSPECTIVES**



On estime à plus de 400 millions de porteurs chroniques HBV dans le monde dont 16% vivent en Afrique. L'infection HBV est à l'origine de plus d'1 million de décès annuels parmi lesquels 250.000 surviennent en Afrique ([Andernach et al., 2009a](#)). Dans cette partie du monde, la transmission de l'HBV se fait généralement pendant la petite enfance et le passage à la chronicité est très élevé (>80%), avec pour conséquences des complications éventuelles de cirrhose ou de carcinome hépatocellulaire. En effet, l'absence de suivi organisé de cette infection à large échelle et l'existence de nombreux facteurs socio-économiques et sanitaires défavorables rendent la situation plus difficile pour l'Afrique.

Actuellement, presque tous les pays africains ont inclus le vaccin contre l'HBV dans leur programme élargi de vaccination. Mais, contrairement aux pays d'Asie du Sud-est, la mise en place de cette vaccination a été très tardive et le taux de couverture vaccinale est très variable d'un pays à un autre allant de 27% à 99% (données de 2005) (WHO vaccine-preventable disease: monitoring system, 2006 global summary; WHO, Immunization, Vaccines and Biologicals, 2006).

Au Niger, notamment, situé dans la région du Sahara, deux études, l'une ancienne chez des sujets sains ([Soubiran et al., 1987](#)), l'autre récente en population générale ([Mamadou et al., 2006](#)), font état respectivement d'une prévalence de l'AgHBs de 17,6% et 19,2%.

En Mauritanie, deux études, réalisées dans les années 90, ont montré une prévalence de l'AgHBs de 16,8 % chez des enfants scolarisés, et de 17 à 20 % chez les donneurs de sang ([Tognarelli et al., 1994](#)) ([Kurbanov et al., 2005](#)).

Nous avons collaboré avec des équipes mauritaniennes afin de réaliser des études dans différents groupes de la population Mauritanienne (Femmes enceintes (n=1020), consultants (n=954) et donneurs de sang (n=11110)). Dans ces trois cohortes d'un total de 13066 sujets, 1982 (15,2%) d'entre eux étaient AgHBs(+), se répartissant comme suit : 10.7% chez les femmes enceintes, 18.3 % chez les consultants et 15.3 % chez les donneurs de sang. Très peu

de données étaient disponibles jusque là quant à la séroprévalence de l'infection par l'HBV chez les femmes enceintes et aux risques de transmission de la mère à l'enfant en Mauritanie.

Sur le plan de la prévention, une vaccination systématique des nourrissons contre l'HBV (inclusion de la valence HBV dans les autres vaccins : tétanos, polio, coqueluche, diphtérie) a été instaurée à l'âge de trois mois depuis 2004. Le dépistage de l'AgHBs est réalisé pendant la grossesse mais l'évaluation de la répllication virale chez la mère n'est pas réalisée en raison de son coût.

En Mauritanie, les seules études rapportant la prévalence de l'AgHBs datent du début des années 1990, avec des taux estimés entre 16 et 20%. Nous avons retrouvé 20 ans après, une prévalence de l'AgHBs de 10,7 % à 18,3 % (selon la population étudiée). Cette stabilité relative de la prévalence peut être expliquée par le fait que la population étudiée, âgée de plus de 14 ans, n'a pas été concernée par le programme national de vaccination des nourrissons qui a débuté fin 2004.

Dans les pays où des campagnes supplémentaires de vaccination contre l'HBV existent, une baisse significative des marqueurs de l'HBV a été notée, en Sicile par exemple, la vaccination des enfants âgés de 12 ans a permis la baisse du taux d'anti-HBc de 18 % chez les femmes âgées de plus de 40 ans à 1,7 % chez les femmes jeunes dont la tranche d'âge était ciblée par ces campagnes ([Bonura et al., 2005](#)).

La prévalence de l'AgHBs dans les pays de la région sub-saharienne, tels le Mali (15,5%), le Sénégal (13,8 %), est similaire à celle notée dans notre série en Mauritanie, mais elle est cependant beaucoup moins élevée dans des pays de l'Afrique de Nord, tels la Tunisie (4%), le Maroc (2,5%) ou l'Algérie (2,15%) ([Hannachi et al., 2009](#)) ([Kitab et al., 2011](#)).

Dans notre étude, moins de 5 % des femmes enceintes positives pour l'AgHBs ont une forte répllication virale ( $> 5 \log_{10} \text{UI/ml}$ ). Cependant, il existe que même un risque important pour les nouveau-nés de ces mères infectées. Il a même été rapporté la possibilité d'hépatite

fulminante chez un nourrisson contaminé malgré une faible virémie maternelle ([Schaefer et al., 1993](#)). Les nouveau-nés devraient, donc, bénéficier de la vaccination à la naissance et d'un protocole d'immunoprophylaxie renforcé avec, par exemple, une seconde injection d'immunoglobulines anti-HBs à l'âge d'un mois.

L'HBV a une forte capacité répliquative, mais celle-ci est associée à un fort taux d'erreurs de la polymérase virale lors de la réplication du génome. Ces 2 éléments permettent au virus de s'adapter facilement à son hôte.

L'évolution génétique de l'HBV a conduit à l'émergence d'au moins huit génotypes (A-H) et au moins de 34 sous génotypes et de nombreux recombinaisons. Selon la zone géographique considérée, la prévalence de chaque génotype est différente. Le génotype le plus prévalent en Afrique subsaharienne est le génotype E alors que l'Afrique du Nord est caractérisée par la prévalence importante de génotype D. Au Niger, nous avons trouvé outre la présence de l'HBV/E, un nouveau recombinaison HBV/D-E. Le taux de divergence de plus de 4% par rapport aux autres sous génotypes HBV/D décrits à ce jour et les valeurs de bootstrap et de probabilité postérieure de 100% chacune nous ont permis de définir ce nouveau recombinaison comme un nouveau sous génotype : l'HBV/D8. Le fort taux de prévalence de plus de 20% (4 des 24 échantillons testés) laissait supposer que ce nouveau sous génotype circulait non seulement au Niger, mais aussi dans certains pays voisins comme la Mauritanie où nous disposions de plusieurs collaborations scientifiques avec des équipes locales.

En Mauritanie, après avoir génotypé 240 souches, nous avons découvert que 3 génotypes différents circulaient : l'HBV/A (8,8%), l'HBV/D (56,3%), et l'HBV/E (34,6%). Cette diversité peut être expliquée par la localisation géographique de la Mauritanie comme région frontière et de passage entre l'Afrique du Nord et l'Afrique Sub Saharienne.

Dans notre étude en Mauritanie, nous avons remarqué que plus de 70% de nos souches HBV/A se regroupaient sur une branche distincte des autres sous-génotypes HBV/A, formant

soit un isolat mauritanien soit un nouveau sous-génotype. Nous avons commencé les expériences de séquençage complet du génome de ces souches afin de caractériser ces souches.

De plus, nous avons trouvé les sous-génotypes HBV/D suivants : D2, D4, D7 et D8. De façon intéressante, plus de 30% des sous-génotypes D circulant en Mauritanie, étaient HBV/D8, le nouveau sous-génotype que nous avons isolé et caractérisé au Niger. Nos études en Mauritanie et au Niger indiquent que le D8 est répandu dans la région saharienne. Ce nouveau génotype aurait-il un pouvoir oncogène plus grand lié à des événements d'intégration dans le génome cellulaire en rapport un potentiel de recombinaison génétique ? Le séquençage complet du génome de toutes ces souches HBV/D8 mauritaniennes est en cours afin de les caractériser sur le plan moléculaire.

Le génotype E a aussi été identifié en Mauritanie, comme le deuxième génotype le plus prévalent (après le HBV/D). La diversité génétique intra-génomique moyenne au sein des souches de génotype E est de l'ordre de 1,85%, soit l'une des plus faibles observées au sein de différents génotypes de l'HBV. Cependant, cette variabilité génétique semble plus importante au nord qu'au sud de l'Afrique (Andernach et al., 2009a), indiquant une propagation selon un gradient nord sud. Au Niger, le taux de divergence était voisin de 2,52% entre les séquences des souches HBV/E du Niger comparées à celles de la littérature. L'hypothèse formulée serait que l'HBV/E aurait d'abord émergé dans le Nord avant de se propager dans le reste de l'Afrique. La séquence complète de souches HBV/E mauritaniennes sera réalisée afin de calculer la diversité intra génomique. Toutefois, d'autres études seront nécessaires, dans d'autres pays situés à la frontière du Maghreb, pour confirmer cette hypothèse.

Ces différentes données posent la question de l'émergence du génotype E en Afrique, qui serait donc récente (moins de 200 ans) et des modalités de sa propagation (iatrogénique)

jusqu'à devenir aujourd'hui la souche prédominante en Afrique subsaharienne et en Afrique de l'Ouest (Andernach et al., 2009a)

Le génotypage des souches de HBV en Mauritanie et au Niger a permis de rajouter des informations supplémentaires concernant la cartographie des génotypes africains de l'HBV.

Dans notre étude, 14 à 33% des porteurs chroniques HBV sont également infectés par l'HDV. Le continent africain est situé dans une zone de forte endémie pour l'HBV mais la réalité de l'infection HDV, virus satellite de l'HBV, est de façon générale, peu ou mal connue.

Peu d'études ont été publiées sur la séroprévalence de l'infection à HDV en Mauritanie. Elles suggéraient que la prévalence de l'HDV était très élevée (30% chez les donneurs de sang porteurs de l'Ag HBs) ([Tognarelli et al., 1994](#)). Dans notre étude en Mauritanie, celle-ci était 15% chez les femmes enceintes, 19% chez les consultants, 20% chez les donneurs de sang et 33% chez les porteurs chroniques de l'HBV suivi pour une maladie hépatique (étude cas-cas). La prévalence de l'infection delta était significativement plus élevée dans les régions du désert (34,5% chez les consultants, 26,8 % chez les donneurs de sang) que dans les autres régions : région de Fleuve de Sénégal (8,7% chez les consultants, 19,5 % chez les donneurs de sang) et la région de côté Maritime (15,8% chez les consultants, 14,5 % chez les donneurs de sang). Les causes de cette différence sont probablement multifactorielles (mode de vie, habitudes, transmission intrafamiliale, nosocomiale). La moyenne d'âge des sujets HDV positifs était supérieure d'environ cinq années à celle de la population globale AgHBs positive dans les différentes cohortes ( $p < 0.05$ ), en faveur plutôt d'une surinfection B-delta que d'une co-infection chez la population étudiée. Ces éléments suggèrent des modes de transmission liés à certaines pratiques, comme le tatouage, la circoncision traditionnelle, les relations sexuelles, mais également une contamination nosocomiale. En effet, il y a eu de nombreuses campagnes de vaccination et de lutte contre le Pian dans les années 60-70

pouvant être à la source d'une transmission de l'HDV comme cela a été le cas pour l'HCV dans certains pays ([Sievert et al., 2011](#)).

Le géotypage de l'HDV n'a pas encore de justification clinique ou thérapeutique dans le suivi de l'infection. Des études cliniques et d'épidémiologie moléculaire de l'infection HDV dans le monde devront être réalisées.

En Mauritanie, le géotype HDV-1 est largement majoritaire (>90%) mais l'HDV-5 a été isolé chez environ 10% des cas. Les résultats de notre étude enrichissent les données encore limitées de la littérature sur la prévalence de l'infection par l'HDV et sur les géotypes des virus circulants. Certains auteurs ont évoqué la possibilité d'une différence de pouvoir pathogène selon le géotype viral ([Su et al., 2006](#)). Le pouvoir pathogène de l'HDV repose sur des mécanismes multiples et complexes. La possibilité d'une relation entre le géotype HDV et pouvoir pathogène doit nécessairement prendre aussi en compte le géotype de l'HBV auxiliaire. De nombreuses études ont souligné l'impact possible des géotypes HBV sur l'évolution de la maladie liée à l'infection par l'HBV ([Kay and Zoulim, 2007](#)). Il faut cependant prendre en compte de multiples facteurs intercurrents dans l'histoire naturelle de la maladie. De plus, les résultats sont assez difficiles à généraliser du fait de la répartition géographique distincte, à la fois des géotypes et des sous géotypes et que seuls 2 ou 3 géotypes ou sous géotypes HBV circulent à la fois dans un pays donné.

Le rôle de la diversité génétique de HBV sur l'évolution de la maladie reste contradictoire selon les études. Ces différences pourraient être dues au fait que les souches attribués à un même géotype pourrait appartenir aux sous-géotypes différents

Il sera intéressant de vérifier si cette diversité a un impact sur l'infection. Notamment, des études sur les recombinants HBV/D-E (sous-géotype HBV/D8) circulant au Niger et en Mauritanie, permettraient d'explorer leur pouvoir infectieux et leur implication dans la survenue du carcinome hépatocellulaire. Dans notre étude « cas-cas », nous sommes en train

de compléter les analyses afin d'évaluer le rôle de la diversité génétique de l'HBV et notamment le recombinant D8 sur la sévérité de la maladie hépatique.

L'infection par l'HDV est souvent associée à une maladie sévère dont la prise en charge thérapeutique repose sur l'administration chaque semaine d'interféron pégylé pendant au moins 18 mois, avec souvent une rechute à l'arrêt du traitement. Nous avons rapporté un cas de résolution de l'infection HBV/HDV suite à une bi-thérapie par analogue de nucléotide + interféron pour un patient d'origine de Daguestan. Le patient était infecté par des virus de génotypes HBV/D et HDV-1, et avait des charges virales HBV et HDV élevées ([Mansour et al., 2010](#)) (voir article et posters/ article ; page-215). Cependant, la plupart des essais ayant évalué l'intérêt d'une bithérapie versus une monothérapie par interféron n'ont pas montré d'efficacité supérieure dans le bras bithérapie. La façon de combiner ces deux thérapeutiques au mieux n'est pas encore connue ([Wolters et al., 2000](#)). Pour l'instant, il n'y a pas encore de données permettant formellement de lier la sévérité de la maladie hépatique et la réponse aux traitements antiviraux en fonction du génotype des souches infectantes. De plus, d'autres paramètres peuvent influencer l'évolution de la maladie hépatique et la réponse au traitement : facteurs génétiques, alcoolisme, co-infection avec l'HCV ou l'HIV, facteurs environnementaux, accès aux soins. L'accumulation des données demeure nécessaire dans ce domaine même si la limite majeure de telles études est le fait qu'un nombre limité de génotypes différents circulent à la fois sur un même territoire.

En conclusion, ces études réalisées en Mauritanie et au Niger soulignent encore la forte prévalence des hépatites B et Delta dans ces pays. La prise de conscience des pays africains, concernant la nécessité de considérer ces infections comme un problème de santé publique, s'est récemment traduite par l'Appel de Dakar (<http://www.hepatites.sn/lappel-de-dakar.html>) renforçant la nécessité d'une vaccination à la naissance et l'accès à la clinique et

thérapeutique de ces infections au même titre que l'HIV avec dans chaque pays la nomination d'un coordinateur du programme de lutte contre les hépatites.

Le géotypage des souches de HBV et HDV, en Mauritanie et au Niger, a permis de rajouter des informations supplémentaires concernant la cartographie des géotypes africains des virus HBV et HDV. Cela nous permettra de vérifier si cette diversité a un impact sur l'histoire naturelle de la maladie hépatique. En particulier les études sur les recombinants HBV/D-E (HBV/D8) hautement prévalent au Niger et en Mauritanie, permettront d'explorer leur pouvoir infectieux et leur implication dans la survenue du carcinome hépatocellulaire. D'autres études dans les pays voisin comme le Mali et Tchad seront nécessaires pour compléter la cartographie de géotype B et Delta dans la région de Sahara.



## 4 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, K., Hayakawa, E., Sminov, A.V., Rossina, A.L., Ding, X., Huy, T.T., Sata, T., Uchaikin, V.F., 2004. Molecular epidemiology of hepatitis B, C, D and E viruses among children in Moscow, Russia. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 30, 57-61.
- Abou-Jaoude, G., Molina, S., Maurel, P., Sureau, C., 2007. Myristoylation signal transfer from the large to the middle or the small HBV envelope protein leads to a loss of HDV particles infectivity. *Virology* 365, 204-209.
- Aceti, A., Mohamed, O.M., Paparo, B.S., Mohamud, O.M., Quaranta, G., Maalin, K.A., Sebastiani, A., 1991. High prevalence of anti-hepatitis delta virus antibody in chronic liver disease in Somalia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 541-542.
- Akuta, N., Kumada, H., 2005. Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies. *J Antimicrob Chemother* 55, 139-142.
- Alter, M.J., 2003. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *Journal of hepatology* 39 Suppl 1, S64-69.
- Amazigo, U.O., Chime, A.B., 1990. Hepatitis-B virus infection in rural and urban populations of eastern Nigeria: prevalence of serological markers. *East African medical journal* 67, 539-544.
- Andernach, I.E., Hubschen, J.M., Muller, C.P., 2009a. Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. *Reviews in medical virology* 19, 231-240.
- Andernach, I.E., Nolte, C., Pape, J.W., Muller, C.P., 2009b. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerging infectious diseases* 15, 1222-1228.
- Antona, D., Leveque, N., Chomel, J.J., Dubrou, S., Levy-Bruhl, D., Lina, B., 2007. Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 26, 403-412.
- Araujo, N.M., Waizbort, R., Kay, A., 2011. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: how viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 11, 1199-1207.
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B.H., Magnius, L.O., 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *The Journal of general virology* 83, 2059-2073.
- Banerjee, A., Kurbanov, F., Datta, S., Chandra, P.K., Tanaka, Y., Mizokami, M., Chakravarty, R., 2006. Phylogenetic relatedness and genetic diversity of hepatitis B virus isolates in Eastern India. *Journal of medical virology* 78, 1164-1174.
- Barros, L.M., Gomes-Gouvea, M.S., Pinho, J.R., Alvarado-Mora, M.V., Dos Santos, A., Mendes-Correa, M.C., Caldas, A.J., Sousa, M.T., Santos, M.D., Ferreira, A.S., 2011. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus research* 160, 333-339.
- Bartenschlager, R., Junker-Niepmann, M., Schaller, H., 1990. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *Journal of virology* 64, 5324-5332.
- Beck, J., Nassal, M., 2007. Hepatitis B virus replication. *World journal of gastroenterology : WJG* 13, 48-64.
- Bekondi, C., Olinger, C.M., Boua, N., Talarmin, A., Muller, C.P., Le Faou, A., Venard, V., 2007. Central African Republic is part of the West-African hepatitis B virus genotype E crescent. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 40, 31-37.
- Bergmann, K.F., Cote, P.J., Moriarty, A., Gerin, J.L., 1989. Hepatitis delta antigen. Antigenic structure and humoral immune response. *Journal of immunology* 143, 3714-3721.
- Bialek, S.R., Bower, W.A., Mottram, K., Purchase, D., Nakano, T., Nainan, O., Williams, I.T., Bell, B.P., 2005. Risk factors for hepatitis B in an outbreak of hepatitis B and D among injection drug users. *Journal of urban health : bulletin of the New York Academy of Medicine* 82, 468-478.

- Biswas, A., Chandra, P.K., Datta, S., Panigrahi, R., Banerjee, A., Chakrabarti, S., Biswas, K., Patra, D., Bhattacharya, P., Biswas, K., Chakravarty, R., 2009. Frequency and distribution of hepatitis B virus genotypes among eastern Indian voluntary blood donors: Association with precore and basal core promoter mutations. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 39, 53-59.
- Blanchet, M., Sureau, C., 2007. Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *Journal of virology* 81, 5841-5849.
- Blumberg, B.S., Alter, H.J., Visnich, S., 1965. A "New" Antigen In Leukemia Sera. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 191, 541-546.
- Bock, C.T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M.P., Trautwein, C., Zentgraf, H., 2001. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *Journal of molecular biology* 307, 183-196.
- Bond, W.W., Favero, M.S., Petersen, N.J., Gravelle, C.R., Ebert, J.W., Maynard, J.E., 1981. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. *Lancet* 1, 550-551.
- Bonura, F., Sorgi, M., Perna, A.M., Puccio, G., Tramuto, F., Cajozzo, C., Romano, N., Vitale, F., 2005. Pregnant women as a sentinel population to target and implement hepatitis B virus (HBV) vaccine coverage: a three-year survey in Palermo, Sicily. *Vaccine* 23, 3243-3246.
- Bowyer, S.M., van Staden, L., Kew, M.C., Sim, J.G., 1997. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *The Journal of general virology* 78 ( Pt 7), 1719-1729.
- Bozdayi, A.M., Aslan, N., Bozdayi, G., Turkyilmaz, A.R., Sengezer, T., Wend, U., Erkan, O., Aydemir, F., Zakirhodjaev, S., Orucov, S., Bozkaya, H., Gerlich, W., Karayalcin, S., Yurdaydin, C., Uzunalmoglu, O., 2004. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Archives of virology* 149, 2115-2129.
- Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B., Tiollais, P., 1980. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* 286, 533-535.
- Buendia, M.A., 1992. Mammalian hepatitis B viruses and primary liver cancer. *Semin Cancer Biol* 3, 309-320.
- Buendia, M.A., 2000. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 10, 185-200.
- Candotti, D., Danso, K., Allain, J.P., 2007. Maternofetal transmission of hepatitis B virus genotype E in Ghana, west Africa. *The Journal of general virology* 88, 2686-2695.
- Casey, J.L., 2006. RNA editing in hepatitis delta virus. *Current topics in microbiology and immunology* 307, 67-89.
- Casey, J.L., Brown, T.L., Colan, E.J., Wignall, F.S., Gerin, J.L., 1993. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9016-9020.
- Casey, J.L., Niro, G.A., Engle, R.E., Vega, A., Gomez, H., McCarthy, M., Watts, D.M., Hyams, K.C., Gerin, J.L., 1996. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *The Journal of infectious diseases* 174, 920-926.
- Castelnaud, C., Le Gal, F., Ripault, M.P., Gordien, E., Martinot-Peignoux, M., Boyer, N., Pham, B.N., Maylin, S., Bedossa, P., Deny, P., Marcellin, P., Gault, E., 2006. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology* 44, 728-735.
- Cenac, A., Pedroso, M.L., Djibo, A., Develoux, M., Pichoud, C., Lamothe, F., Trepo, C., 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, 293-296.

- Chan, H.L., Tsui, S.K., Tse, C.H., Ng, E.Y., Au, T.C., Yuen, L., Bartholomeusz, A., Leung, K.S., Lee, K.H., Locarnini, S., Sung, J.J., 2005. Epidemiological and virological characteristics of 2 subgroups of hepatitis B virus genotype C. *The Journal of infectious diseases* 191, 2022-2032.
- Chan, H.L., Wong, M.L., Hui, A.Y., Hung, L.C., Chan, F.K., Sung, J.J., 2003. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients. *Journal of clinical microbiology* 41, 1277-1279.
- Chang, J., Gudima, S.O., Taylor, J.M., 2005. Evolution of hepatitis delta virus RNA genome following long-term replication in cell culture. *Journal of virology* 79, 13310-13316.
- Chang, M.H., 2000. Natural history of hepatitis B virus infection in children. *Journal of gastroenterology and hepatology* 15 Suppl, E16-19.
- Chang, S.F., Netter, H.J., Bruns, M., Schneider, R., Frolich, K., Will, H., 1999. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology* 262, 39-54.
- Chao, Y.C., Chang, M.F., Gust, I., Lai, M.M., 1990. Sequence conservation and divergence of hepatitis delta virus RNA. *Virology* 178, 384-392.
- Chao, Y.C., Tang, H.S., Hsu, C.T., 1994. Evolution rate of hepatitis delta virus RNA isolated in Taiwan. *Journal of medical virology* 43, 397-403.
- Chen, H.S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R.W., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H., Miller, R.H., 1993. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *Journal of virology* 67, 1218-1226.
- Chien, R.N., 2008. Current therapy for hepatitis C or D or immunodeficiency virus concurrent infection with chronic hepatitis B. *Hepatology* 47, 296-303.
- Chu, C.J., Keeffe, E.B., Han, S.H., Perrillo, R.P., Min, A.D., Soldevila-Pico, C., Carey, W., Brown, R.S., Jr., Luketic, V.A., Terrault, N., Lok, A.S., 2003. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* 125, 444-451.
- Chu, C.M., Liaw, Y.F., 2007. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: appreciably high rates during a long-term follow-up. *Hepatology* 45, 1187-1192.
- Crovati, P., Santolini, M., Bandettini, R., Bonanni, P., Branca, P., Coppola, R.C., 1991. Epidemiology of HBV and HDV infections in a rural area of Central African Republic. *Progress in clinical and biological research* 364, 69-73.
- Cui, C., Shi, J., Hui, L., Xi, H., Zhuoma, Q., Quni, T., Tsedan, H., G., 2002. The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *The Journal of general virology* 83, 2773-2777.
- da Fonseca, J.C., Simonetti, J.P., 1987. Epidemiology of the hepatitis delta virus (HDV) in Brazil. *Progress in clinical and biological research* 234, 507-514.
- Dane, D.S., Cameron, C.H., Briggs, M., 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1, 695-698.
- Devesa, M., Rodriguez, C., Leon, G., Liprandi, F., Pujol, F.H., 2004. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. *Journal of medical virology* 72, 377-384.
- Diao, J., Garces, R., Richardson, C.D., 2001. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 189-205.
- Ducancelle, A., Servant-Delmas, A., Beuvelet, T., Balan, V., Pivert, A., Maniez, M., Laperche, S., Lunel-Fabiani, F., 2011. [Results of a novel real-time PCR, sequence analysis, Inno-LiPA line probe assays in the

detection of hepatitis B virus G1896A precore mutation in French blood donors]. *Pathologie-biologie* 59, e21-27.

Ducancelle, A. Pivert, A. Lunel-Fabiani, F. Les mutants précore et du promoteur basal du core du virus de l'hépatite B. *Virologie* 2011; 15(2) : 100-14

EASL, 2009. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *Journal of hepatology* 50, 227-242.

Engelke, M., Mills, K., Seitz, S., Simon, P., Gripon, P., Schnolzer, M., Urban, S., 2006. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* 43, 750-760.

Erhardt, A., Blondin, D., Hauck, K., Sagir, A., Kohnle, T., Heintges, T., Haussinger, D., 2005. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 54, 1009-1013.

Erhardt, A., Starke, C., Loerke, J., Giesecke, C., Heintges, T., Haussinger, D., 2006. [Update hepatitis D]. *Medizinische Klinik* 101 Suppl 1, 127-134.

Ezzikouri, S., Chemin, I., Chafik, A., Wakrim, L., Nourlil, J., Malki, A.E., Marchio, A., Dejean, A., Hassar, M., Trepo, C., Pineau, P., Benjelloun, S., 2008. Genotype determination in Moroccan hepatitis B chronic carriers. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 8, 306-312.

Farci, P., 2003. Delta hepatitis: an update. *Journal of hepatology* 39 Suppl 1, S212-219.

Farci, P., Gerin, J.L., Aragona, M., Lindsey, I., Crivelli, O., Balestrieri, A., Smedile, A., Thomas, H.C., Rizzetto, M., 1986. Diagnostic and prognostic significance of the IgM antibody to the hepatitis delta virus. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 255, 1443-1446.

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

Fattovich, G., Bortolotti, F., Donato, F., 2008. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *Journal of hepatology* 48, 335-352.

Fattovich, G., Giustina, G., Christensen, E., Pantalena, M., Zagni, I., Realdi, G., Schalm, S.W., 2000. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* 46, 420-426.

Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., Donato, F., 2004. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 127, S35-50.

Feitelson, M.A., Lee, J., 2007. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer letters* 252, 157-170.

Fiedler, M., Roggendorf, M., 2006. Immunology of HDV infection. *Current topics in microbiology and immunology* 307, 187-209.

Flodgren, E., Bengtsson, S., Knutsson, M., Strebkova, E.A., Kidd, A.H., Alexeyev, O.A., Kidd-Ljunggren, K., 2000. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains. *Journal of clinical microbiology* 38, 3311-3316.

Foupouapouognigni, Y., Noah, D.N., Sartre, M.T., Njouom, R., 2011. High prevalence and predominance of hepatitis delta virus genotype 1 infection in Cameroon. *Journal of clinical microbiology* 49, 1162-1164.

Fujiwara, K., Tanaka, Y., Orito, E., Ohno, T., Kato, T., Sugihara, K., Hasegawa, I., Sakurai, M., Ito, K., Ozasa, A., Sakamoto, Y., Arita, I., El-Gohary, A., Benoit, A., Ogoundele-Akplogan, S.I., Yoshihara, N., Ueda, R.,

- Mizokami, M., 2005. Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin: phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E. *World journal of gastroenterology* : WJG 11, 6410-6415.
- Gaeta, G.B., Stroffolini, T., Chiamonte, M., Ascione, T., Stornaiuolo, G., Lobello, S., Sagnelli, E., Brunetto, M.R., Rizzetto, M., 2000. Chronic hepatitis D: a vanishing Disease? An Italian multicenter study. *Hepatology* 32, 824-827.
- Ganem, D., 1991. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Current topics in microbiology and immunology* 168, 61-83.
- Ganem, D., 2001. Virology. The X files--one step closer to closure. *Science* 294, 2299-2300.
- Ganne-Carrie, N., Williams, V., Kaddouri, H., Trinchet, J.C., Dziri-Mendil, S., Alloui, C., Hawajri, N.A., Deny, P., Beaugrand, M., Gordien, E., 2006. Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *Journal of medical virology* 78, 335-340.
- Garmiri, P., Loua, A., Haba, N., Candotti, D., Allain, J.P., 2009. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa. *The Journal of general virology* 90, 2442-2451.
- Gilbert, R.J., Beales, L., Blond, D., Simon, M.N., Lin, B.Y., Chisari, F.V., Stuart, D.I., Rowlands, D.J., 2005. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14783-14788.
- Glenn, J.S., Watson, J.A., Havel, C.M., White, J.M., 1992. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science* 256, 1331-1333.
- Gomes-Gouvea, M.S., Pereira Soares Mdo, C., Guedes de Carvalho Mello, I.M., Brito, E.M., Pereira Moia Lde, J., Bensabath, G., Nunes, H.M., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2008. Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin. *Acta tropica* 106, 149-155.
- Gomes-Gouvea, M.S., Soares, M.C., Bensabath, G., de Carvalho-Mello, I.M., Brito, E.M., Souza, O.S., Queiroz, A.T., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2009. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *The Journal of general virology* 90, 2638-2643.
- Gowans, E.J., Bonino, F., 1993. Hepatitis delta virus pathogenicity. *Progress in clinical and biological research* 382, 125-130.
- Gozlan, J., Lacombe, K., Gault, E., Raguin, G., Girard, P.M., 2009. Complete cure of HBV-HDV co-infection after 24 weeks of combination therapy with pegylated interferon and ribavirin in a patient co-infected with HBV/HCV/HDV/HIV. *Journal of hepatology* 50, 432-434.
- Grethe, S., Heckel, J.O., Rietschel, W., Hufert, F.T., 2000. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *Journal of virology* 74, 5377-5381.
- Gu, X., Li, Q., Wang, Y., 2001. [Expression of bcl-2, bax and hepatocyte apoptosis in the liver tissues of hepatitis D patients]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology* 9, 81-83.
- Guzelbulut, F., Ovunc, A.O., Oetinkaya, Z.A., Senates, E., Gokden, Y., Salturk, A.G., Sezikli, M., Ozkara, S., Oetinkaya, F., 2012. Comparison of the efficacy of entecavir and tenofovir in chronic hepatitis B. *Hepato-gastroenterology* 59, 477-480.
- Hadler, S.C., De Monzon, M., Ponzetto, A., Anzola, E., Rivero, D., Mondolfi, A., Bracho, A., Francis, D.P., Gerber, M.A., Thung, S., et al., 1984. Delta virus infection and severe hepatitis. An epidemic in the Yucpa Indians of Venezuela. *Annals of internal medicine* 100, 339-344.

- Hadziyannis, S.J., Tassopoulos, N.C., Heathcote, E.J., Chang, T.T., Kitis, G., Rizzetto, M., Marcellin, P., Lim, S.G., Goodman, Z., Ma, J., Brosgart, C.L., Borroto-Esoda, K., Arterburn, S., Chuck, S.L., 2006. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology* 131, 1743-1751.
- Hadziyannis, S.J., Vassilopoulos, D., 2001. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 34, 617-624.
- Halpern, M.S., England, J.M., Deery, D.T., Petcu, D.J., Mason, W.S., Molnar-Kimber, K.L., 1983. Viral nucleic acid synthesis and antigen accumulation in pancreas and kidney of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 4865-4869.
- Hannachi, N., Bahri, O., Mhalla, S., Marzouk, M., Sadraoui, A., Belguith, A., Triki, H., Boukadida, J., 2009. [Hepatitis B virus infection in Tunisian pregnant women: risk factors and viral DNA levels in HBe antigen negative women]. *Pathologie-biologie* 57, e43-47.
- Hannoun, C., Norder, H., Lindh, M., 2000. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *The Journal of general virology* 81, 2267-2272.
- Hannoun, C., Soderstrom, A., Norkrans, G., Lindh, M., 2005. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *The Journal of general virology* 86, 2163-2167.
- Henkler, F., Waseem, N., Golding, M.H., Alison, M.R., Koshy, R., 1995. Mutant p53 but not hepatitis B virus X protein is present in hepatitis B virus-related human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 55, 6084-6091.
- Hess, G., Arnold, W., Koesters, W., Biswas, R., Hutteroth, T.H., zum Buschenfelde, K.H., 1977. Simultaneous presence of HBsAg and anti-HBs in the serum of different subtypes (serological and immunofluorescent studies). *Z Immunitätsforsch Immunobiol* 153, 143-151.
- Hézode, C., 2010. [Histoire Naturelle de l'Hépatite B]. *Virologie* 14, 5-11.
- Hirsch, R.C., Lavine, J.E., Chang, L.J., Varmus, H.E., Ganem, D., 1990. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* 344, 552-555.
- Hoofnagle, J.H., 2009. Reactivation of hepatitis B. *Hepatology* 49, S156-165.
- Huang, J., Liang, T.J., 1993. A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Molecular and cellular biology* 13, 7476-7486.
- Huang, M., Summers, J., 1994. *pet*, a small sequence distal to the pregenome cap site, is required for expression of the duck hepatitis B virus pregenome. *Journal of virology* 68, 1564-1572.
- Huang, Z.M., Yen, T.S., 1995. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Molecular and cellular biology* 15, 3864-3869.
- Hubschen, J.M., Mbah, P.O., Forbi, J.C., Otegbayo, J.A., Olinger, C.M., Charpentier, E., Muller, C.P., 2011. Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 88-94.
- Hubschen, J.M., Mugabo, J., Peltier, C.A., Karasi, J.C., Sausy, A., Kirpach, P., Arendt, V., Muller, C.P., 2009. Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide. *Journal of medical virology* 81, 435-440.
- Huy, T.T., Ishikawa, K., Ampofo, W., Izumi, T., Nakajima, A., Ansah, J., Tetteh, J.O., Nii-Trebi, N., Aidoo, S., Ofori-Adjei, D., Sata, T., Ushijima, H., Abe, K., 2006. Characteristics of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicate the endemicity of genotype E in West Africa. *Journal of medical virology* 78, 178-184.

- Hwang, G.Y., Lin, C.Y., Huang, L.M., Wang, Y.H., Wang, J.C., Hsu, C.T., Yang, S.S., 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, 5598-5603.
- Hwang, S.B., Lai, M.M., 1993. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *Journal of virology* 67, 7659-7662.
- Imazeki, F., Omata, M., Ohto, M., 1990. Heterogeneity and evolution rates of delta virus RNA sequences. *Journal of virology* 64, 5594-5599.
- Inoue, J., Takahashi, M., Nishizawa, T., Narantuya, L., Sakuma, M., Kagawa, Y., Shimosegawa, T., Okamoto, H., 2005. High prevalence of hepatitis delta virus infection detectable by enzyme immunoassay among apparently healthy individuals in Mongolia. *Journal of medical virology* 76, 333-340.
- Ivaniushina, V., Radjef, N., Alexeeva, M., Gault, E., Semenov, S., Salhi, M., Kiselev, O., Deny, P., 2001. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *The Journal of general virology* 82, 2709-2718.
- Jayan, G.C., Casey, J.L., 2002. Inhibition of hepatitis delta virus RNA editing by short inhibitory RNA-mediated knockdown of ADAR1 but not ADAR2 expression. *Journal of virology* 76, 12399-12404.
- Jilbert, A.R., Freiman, J.S., Gowans, E.J., Holmes, M., Cossart, Y.E., Burrell, C.J., 1987. Duck hepatitis B virus DNA in liver, spleen, and pancreas: analysis by in situ and Southern blot hybridization. *Virology* 158, 330-338.
- Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R., Schaller, H., 1990. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *The EMBO journal* 9, 3389-3396.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H., Helenius, A., 1999. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *The Journal of cell biology* 145, 45-55.
- Kao, J.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., Chen, D.S., 2002. Hepatitis D virus genotypes in intravenous drug users in taiwan: decreasing prevalence and lack of correlation with hepatitis B virus genotypes. *Journal of clinical microbiology* 40, 3047-3049.
- Kao, J.H., Wu, N.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., Chen, D.S., 2000. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *Journal of hepatology* 33, 998-1002.
- Kato, H., Fujiwara, K., Gish, R.G., Sakugawa, H., Yoshizawa, H., Sugauchi, F., Orito, E., Ueda, R., Tanaka, Y., Kato, T., Miyakawa, Y., Mizokami, M., 2005. Classifying genotype F of hepatitis B virus into F1 and F2 subtypes. *World journal of gastroenterology : WJG* 11, 6295-6304.
- Kato, H., Gish, R.G., Bzowej, N., Newsom, M., Sugauchi, F., Tanaka, Y., Kato, T., Orito, E., Usuda, S., Ueda, R., Miyakawa, Y., Mizokami, M., 2004. Eight genotypes (A-H) of hepatitis B virus infecting patients from San Francisco and their demographic, clinical, and virological characteristics. *Journal of medical virology* 73, 516-521.
- Kato, H., Orito, E., Gish, R.G., Sugauchi, F., Suzuki, S., Ueda, R., Miyakawa, Y., Mizokami, M., 2002a. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *Journal of virology* 76, 6131-6137.
- Kato, H., Ruzibakiev, R., Yuldasheva, N., Hegay, T., Kurbanov, F., Achundjanov, B., Tuichiev, L., Usuda, S., Ueda, R., Mizokami, M., 2002b. Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping. *Journal of medical virology* 67, 477-483.
- Kay, A., Zoulim, F., 2007. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus research* 127, 164-176.
- Kew, M.C., 2002. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 181-182, 35-38.



- Khelifa, F., Thibault, V., 2009. [Characteristics of hepatitis B viral strains in chronic carrier patients from North-East Algeria]. *Pathologie-biologie* 57, 107-113.
- Kidd-Ljunggren, K., Miyakawa, Y., Kidd, A.H., 2002. Genetic variability in hepatitis B viruses. *The Journal of general virology* 83, 1267-1280.
- Kimbi, G.C., Kramvis, A., Kew, M.C., 2004. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *The Journal of general virology* 85, 1211-1220.
- Kitab, B., El Feydi, A.E., Afifi, R., Derdabi, O., Cherradi, Y., Benazzouz, M., Rebbani, K., Brahim, I., Salih Alj, H., Zoulim, F., Trepo, C., Chemin, I., Ezzikouri, S., Benjelloun, S., 2011. Hepatitis B genotypes/subgenotypes and MHR variants among Moroccan chronic carriers. *The Journal of infection* 63, 66-75.
- Kos, A., Dijkema, R., Arnberg, A.C., van der Meide, P.H., Schellekens, H., 1986. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature* 323, 558-560.
- Kramvis, A., Arakawa, K., Yu, M.C., Nogueira, R., Stram, D.O., Kew, M.C., 2008. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *Journal of medical virology* 80, 27-46.
- Kramvis, A., Kew, M.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, S9-S19.
- Kramvis, A., Restorp, K., Norder, H., Botha, J.F., Magnius, L.O., Kew, M.C., 2005. Full genome analysis of hepatitis B virus genotype E strains from South-Western Africa and Madagascar reveals low genetic variability. *Journal of medical virology* 77, 47-52.
- Kramvis, A., Weitzmann, L., Owiredu, W.K., Kew, M.C., 2002. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *The Journal of general virology* 83, 835-839.
- Kremsdorf, D., Soussan, P., Paterlini-Brechot, P., Brechot, C., 2006. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* 25, 3823-3833.
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., Fujiwara, K., Sugauchi, F., Mbanya, D., Zekeng, L., Ndembi, N., Ngansop, C., Kaptue, L., Miura, T., Ido, E., Hayami, M., Ichimura, H., Mizokami, M., 2005. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *The Journal of general virology* 86, 2047-2056.
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., Kramvis, A., Simmonds, P., Mizokami, M., 2008. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *Journal of virology* 82, 8241-8242.
- Lai, C.L., Dienstag, J., Schiff, E., Leung, N.W., Atkins, M., Hunt, C., Brown, N., Woessner, M., Boehme, R., Condreay, L., 2003. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 36, 687-696.
- Lai, M.M., 1995a. Molecular biologic and pathogenetic analysis of hepatitis delta virus. *Journal of hepatology* 22, 127-131.
- Lai, M.M., 1995b. The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annual review of biochemistry* 64, 259-286.
- Lanford, R.E., Chavez, D., Brasky, K.M., Burns, R.B., 3rd, Rico-Hesse, R., 1998. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5757-5761.
- Laoi, B.N., Crowley, B., 2008. Molecular characterization of hepatitis B virus (HBV) isolates, including identification of a novel recombinant, in patients with acute HBV infection attending an Irish hospital. *Journal of medical virology* 80, 1554-1564.

- Lau, D.T., Doo, E., Park, Y., Kleiner, D.E., Schmid, P., Kuhns, M.C., Hoofnagle, J.H., 1999. Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology* 30, 546-549.
- Lazinski, D.W., Taylor, J.M., 1993. Relating structure to function in the hepatitis delta virus antigen. *Journal of virology* 67, 2672-2680.
- Le Gal, F., Badur, S., Hawajri, N.A., Akyuz, F., Kaymakoglu, S., Brichler, S., Zoulim, F., Gordien, E., Gault, E., Deny, P., 2012. Current hepatitis delta virus type 1 (HDV1) infections in central and eastern Turkey indicate a wide genetic diversity that is probably linked to different HDV1 origins. *Archives of virology*.
- Le Gal, F., Gault, E., Ripault, M.P., Serpaggi, J., Trinchet, J.C., Gordien, E., Deny, P., 2006. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerging infectious diseases* 12, 1447-1450.
- Le Gal, F., Gordien, E., Affolabi, D., Hanslik, T., Alloui, C., Deny, P., 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, 2363-2369.
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., Gripon, P., 1999. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *Journal of virology* 73, 2052-2057.
- Lecot, C., Jeantils, V., Ovaguimian, L., Krivitzky, A., Brechot, C., Deny, P., 1993. Polymerase chain reaction-based detection of hepatitis D virus RNA in patients infected with human immunodeficiency virus. *Progress in clinical and biological research* 382, 329-335.
- Lee, C.H., Chang, S.C., Wu, C.H., Chang, M.F., 2001. A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *The Journal of biological chemistry* 276, 8142-8148.
- Lee, C.M., Bih, F.Y., Chao, Y.C., Govindarajan, S., Lai, M.M., 1992. Evolution of hepatitis delta virus RNA during chronic infection. *Virology* 188, 265-273.
- Lee, C.Z., Lin, J.H., Chao, M., McKnight, K., Lai, M.M., 1993. RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication. *Journal of virology* 67, 2221-2227.
- Liaw, Y.F., Tai, D.I., Chu, C.M., Chen, T.J., 1988. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology* 8, 493-496.
- Livingston, S.E., Simonetti, J.P., Bulkow, L.R., Homan, C.E., Snowball, M.M., Cagle, H.H., Negus, S.E., McMahon, B.J., 2007a. Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology* 133, 1452-1457.
- Livingston, S.E., Simonetti, J.P., McMahon, B.J., Bulkow, L.R., Hurlburt, K.J., Homan, C.E., Snowball, M.M., Cagle, H.H., Williams, J.L., Chulanov, V.P., 2007b. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *The Journal of infectious diseases* 195, 5-11.
- Ljunggren, K.E., Patarroyo, M.E., Engle, R., Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1985. Viral hepatitis in Colombia: a study of the "hepatitis of the Sierra Nevada de Santa Marta". *Hepatology* 5, 299-304.
- Lusida, M.I., Nugrahaputra, V.E., Soetjijpto, Handajani, R., Nagano-Fujii, M., Sasayama, M., Utsumi, T., Hotta, H., 2008. Novel subgenotypes of hepatitis B virus genotypes C and D in Papua, Indonesia. *Journal of clinical microbiology* 46, 2160-2166.
- MacDonald, D.M., Holmes, E.C., Lewis, J.C., Simmonds, P., 2000. Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *Journal of virology* 74, 4253-4257.
- Madan, K., Batra, Y., Sreenivas, V., Mizokami, M., Tanaka, Y., Chalamalasetty, S.B., Panda, S.K., Acharya, S.K., 2009. HBV genotypes in India: do they influence disease severity? *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 39, 157-163.

- Makuwa, M., Caron, M., Souquiere, S., Malonga-Mouelet, G., Mahe, A., Kazanji, M., 2008. Prevalence and genetic diversity of hepatitis B and delta viruses in pregnant women in Gabon: molecular evidence that hepatitis delta virus clade 8 originates from and is endemic in central Africa. *Journal of clinical microbiology* 46, 754-756.
- Makuwa, M., Mints-Ndong, A., Souquiere, S., Nkoghe, D., Leroy, E.M., Kazanji, M., 2009. Prevalence and molecular diversity of hepatitis B virus and hepatitis delta virus in urban and rural populations in northern Gabon in central Africa. *Journal of clinical microbiology* 47, 2265-2268.
- Makuwa, M., Souquiere, S., Telfer, P., Apetrei, C., Vray, M., Bedjabaga, I., Mouinga-Ondeme, A., Onanga, R., Marx, P.A., Kazanji, M., Roques, P., Simon, F., 2006. Identification of hepatitis B virus subgenotype A3 in rural Gabon. *Journal of medical virology* 78, 1175-1184.
- Mamadou, S., Laouel Kader, A., Rabiou, S., Aboubacar, A., Soumana, O., Garba, A., Delaporte, E., Mboup, S., 2006. [Prevalence of the HIV infection and five other sexually-transmitted infections among sex workers in Niamey, Niger]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* 99, 19-22.
- Mangus, D.A., Evans, M.C., Jacobson, A., 2003. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4, 223.
- Mansour, W., Ducancelle, A., Le Gal, F., Le Guillou-Guillemette, H., Abgueguen, P., Pivert, A., Cales, P., Gordien, E., Lunel, F., 2010. Resolution of chronic hepatitis Delta after 1 year of combined therapy with pegylated interferon, tenofovir and emtricitabine. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 47, 97-99.
- Marion, P.L., Oshiro, L.S., Regnery, D.C., Scullard, G.H., Robinson, W.S., 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 2941-2945.
- Mason, W.S., Halpern, M.S., England, J.M., Seal, G., Egan, J., Coates, L., Aldrich, C., Summers, J., 1983. Experimental transmission of duck hepatitis B virus. *Virology* 131, 375-384.
- Mason, W.S., Seal, G., Summers, J., 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *Journal of virology* 36, 829-836.
- Matee, M.I., Magesa, P.M., Lyamuya, E.F., 2006. Seroprevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B and C viruses and syphilis infections among blood donors at the Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC public health* 6, 21.
- Mayerat, C., Mantegani, A., Frei, P.C., 1999. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *Journal of viral hepatitis* 6, 299-304.
- Mbayed, V.A., Barbini, L., Lopez, J.L., Campos, R.H., 2001. Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus (HBV) genotype F including Argentine isolates. *Archives of virology* 146, 1803-1810.
- McMahon, B.J., 2004. Viral hepatitis in the Arctic. *International journal of circumpolar health* 63 Suppl 2, 41-48.
- McMahon, B.J., Alward, W.L., Hall, D.B., Heyward, W.L., Bender, T.R., Francis, D.P., Maynard, J.E., 1985. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *The Journal of infectious diseases* 151, 599-603.
- Mehmet, D., Meliksah, E., Serif, Y., Gunay, S., Tuncer, O., Zeynep, S., 2005. Prevalence of hepatitis B infection in the southeastern region of Turkey: comparison of risk factors for HBV infection in rural and urban areas. *Japanese journal of infectious diseases* 58, 15-19.
- Meldal, B.H., Moula, N.M., Barnes, I.H., Boukef, K., Allain, J.P., 2009. A novel hepatitis B virus subgenotype, D7, in Tunisian blood donors. *The Journal of general virology* 90, 1622-1628.

- Mele, A., Mariano, A., Tosti, M.E., Stroffolini, T., Pizzuti, R., Gallo, G., Ragni, P., Zotti, C., Lopalco, P., Curtale, F., Balocchini, E., Spada, E., Group, S.C., 2007. Acute hepatitis delta virus infection in Italy: incidence and risk factors after the introduction of the universal anti-hepatitis B vaccination campaign. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 44, e17-24.
- Miyakawa, Y., Mizokami, M., 2003. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 46, 329-338.
- Mizokami, M., Orito, E., Ohba, K., Ikeya, K., Lau, J.Y., Gojobori, T., 1997. Constrained evolution with respect to gene overlap of hepatitis B virus. *Journal of molecular evolution* 44 Suppl 1, S83-90.
- Moriarty, A.M., Alexander, H., Lerner, R.A., Thornton, G.B., 1985. Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science* 227, 429-433.
- Moriyama, M., Taira, M., Matsumura, H., Aoki, H., Mikuni, M., Kaneko, M., Shioda, A., Iwaguchi, K., Arai, S., Ichijima, S., Iwasaki, H., Tanaka, N., Abe, K., Arakawa, Y., 2003. Genotype analysis, using PCR with type-specific primers, of hepatitis B virus isolates from patients coinfecting with hepatitis delta virus genotype II from Miyako Island, Japan. *Intervirology* 46, 114-120.
- Motta-Castro, A.R., Martins, R.M., Araujo, N.M., Niel, C., Facholi, G.B., Lago, B.V., Mello, F.C., Gomes, S.A., 2008. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. *Archives of virology* 153, 2197-2205.
- Mulders, M.N., Venard, V., Njyou, M., Edorh, A.P., Bola Oyefolu, A.O., Kehinde, M.O., Muyembe Tamfum, J.J., Nebie, Y.K., Maiga, I., Ammerlaan, W., Fack, F., Omilabu, S.A., Le Faou, A., Muller, C.P., 2004. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *The Journal of infectious diseases* 190, 400-408.
- Mulyanto, Depamede, S.N., Surayah, K., Tsuda, F., Ichiyama, K., Takahashi, M., Okamoto, H., 2009. A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. *Archives of virology* 154, 1047-1059.
- Mumtaz, K., Hamid, S.S., Adil, S., Afaq, A., Islam, M., Abid, S., Shah, H.A., Jafri, W., 2005. Epidemiology and clinical pattern of hepatitis delta virus infection in Pakistan. *Journal of gastroenterology and hepatology* 20, 1503-1507.
- Murakami, Y., Saigo, K., Takashima, H., Minami, M., Okanoue, T., Brechot, C., Paterlini-Brechot, P., 2005. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* 54, 1162-1168.
- Nagasaki, F., Niitsuma, H., Cervantes, J.G., Chiba, M., Hong, S., Ojima, T., Ueno, Y., Bondoc, E., Kobayashi, K., Ishii, M., Shimosegawa, T., 2006. Analysis of the entire nucleotide sequence of hepatitis B virus genotype B in the Philippines reveals a new subgenotype of genotype B. *The Journal of general virology* 87, 1175-1180.
- Nakano, T., Shapiro, C.N., Hadler, S.C., Casey, J.L., Mizokami, M., Orito, E., Robertson, B.H., 2001. Characterization of hepatitis D virus genotype III among Yucpa Indians in Venezuela. *The Journal of general virology* 82, 2183-2189.
- Nassal, M., 2008. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus research* 134, 235-249.
- Naumann, H., Schaefer, S., Yoshida, C.F., Gaspar, A.M., Repp, R., Gerlich, W.H., 1993. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *The Journal of general virology* 74 ( Pt 8), 1627-1632.
- Negro, F., Korba, B.E., Forzani, B., Baroudy, B.M., Brown, T.L., Gerin, J.L., Ponzetto, A., 1989. Hepatitis delta virus (HDV) and woodchuck hepatitis virus (WHV) nucleic acids in tissues of HDV-infected chronic WHV carrier woodchucks. *Journal of virology* 63, 1612-1618.
- Netter, H.J., Chassot, S., Chang, S.F., Cova, L., Will, H., 1997. Sequence heterogeneity of heron hepatitis B virus genomes determined by full-length DNA amplification and direct sequencing reveals novel and unique features. *The Journal of general virology* 78 ( Pt 7), 1707-1718.

- Neuveut, C., Wei, Y., Buendia, M.A., 2010. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Journal of hepatology* 52, 594-604.
- Niro, G.A., Casey, J.L., Gravinese, E., Garrubba, M., Conoscitore, P., Sagnelli, E., Durazzo, M., Caporaso, N., Perri, F., Leandro, G., Facciorusso, D., Rizzetto, M., Andriulli, A., 1999. Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence. *Journal of hepatology* 30, 564-569.
- Niro, G.A., Ciancio, A., Gaeta, G.B., Smedile, A., Marrone, A., Olivero, A., Stanzione, M., David, E., Brancaccio, G., Fontana, R., Perri, F., Andriulli, A., Rizzetto, M., 2006. Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta. *Hepatology* 44, 713-720.
- Niro, G.A., Ciancio, A., Tillman, H.L., Lagget, M., Olivero, A., Perri, F., Fontana, R., Little, N., Campbell, F., Smedile, A., Manns, M.P., Andriulli, A., Rizzetto, M., 2005. Lamivudine therapy in chronic delta hepatitis: a multicentre randomized-controlled pilot study. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 22, 227-232.
- Niro, G.A., Smedile, A., Ippolito, A.M., Ciancio, A., Fontana, R., Olivero, A., Valvano, M.R., Abate, M.L., Gioffreda, D., Caviglia, G.P., Rizzetto, M., Andriulli, A., 2010. Outcome of chronic delta hepatitis in Italy: a long-term cohort study. *Journal of hepatology* 53, 834-840.
- Nisini, R., Paroli, M., Accapezzato, D., Bonino, F., Rosina, F., Santantonio, T., Sallusto, F., Amoroso, A., Houghton, M., Barnaba, V., 1997. Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *Journal of virology* 71, 2241-2251.
- Norder, H., Courouce, A.M., Coursaget, P., Echevarria, J.M., Lee, S.D., Mushahwar, I.K., Robertson, B.H., Locarnini, S., Magnius, L.O., 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47, 289-309.
- Norder, H., Ebert, J.W., Fields, H.A., Mushahwar, I.K., Magnius, L.O., 1996. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* 218, 214-223.
- Norder, H., Hammas, B., Lee, S.D., Bile, K., Courouce, A.M., Mushahwar, I.K., Magnius, L.O., 1993. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *The Journal of general virology* 74 ( Pt 7), 1341-1348.
- Norder, H., Hammas, B., Lofdahl, S., Courouce, A.M., Magnius, L.O., 1992. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *The Journal of general virology* 73 ( Pt 5), 1201-1208.
- Ojo, O.S., Akonai, A.K., Thursz, M., Ndububa, D.A., Durosinmi, M.A., Adeodu, O.O., Fatusi, O.A., Goldin, R.D., 1998. Hepatitis D virus antigen in HBsAg positive chronic liver disease in Nigeria. *East African medical journal* 75, 329-331.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R.I., Imai, M., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *The Journal of general virology* 69 ( Pt 10), 2575-2583.
- Olinger, C.M., Lazouskaya, N.V., Eremin, V.F., Muller, C.P., 2008. Multiple genotypes and subtypes of hepatitis B and C viruses in Belarus: similarities with Russia and western European influences. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14, 575-581.
- Olinger, C.M., Venard, V., Njayou, M., Oyefolu, A.O., Maiga, I., Kemp, A.J., Omilabu, S.A., le Faou, A., Muller, C.P., 2006. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *The Journal of general virology* 87, 1163-1173.
- Osiowy, C., Giles, E., Tanaka, Y., Mizokami, M., Minuk, G.Y., 2006. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. *Journal of virology* 80, 10307-10314.

- Otegbayo, J.A., Fasola, F.A., Abja, A., 2003. Prevalence of hepatitis B surface and e antigens, risk factors for viral acquisition and serum transaminase among blood donors in Ibadan, Nigeria. *Tropical gastroenterology : official journal of the Digestive Diseases Foundation* 24, 196-197.
- Ou, J.H., Bao, H., Shih, C., Tahara, S.M., 1990. Preferred translation of human hepatitis B virus polymerase from core protein- but not from precore protein-specific transcript. *Journal of virology* 64, 4578-4581.
- Oyunsuren, T., Kurbanov, F., Tanaka, Y., Elkady, A., Sanduijav, R., Khajidsuren, O., Dagvadorj, B., Mizokami, M., 2006. High frequency of hepatocellular carcinoma in Mongolia; association with mono-, or co-infection with hepatitis C, B, and delta viruses. *Journal of medical virology* 78, 1688-1695.
- Par, A., Luminata, S., Erdosy, I., Doru, D., Kadas, I., Paal, M., Brasch, G., Bero, T., Javor, T., 1992. [Hepatitis virus (HBV, HCV, HDV) markers in chronic liver diseases. Comparative studies in two East-Central European countries]. *Orvosi hetilap* 133 Suppl 1, 48-50.
- Parkin, D.M., Bray, F.I., Devesa, S.S., 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *European journal of cancer* 37 Suppl 8, S4-66.
- Paterlini, P., Poussin, K., Kew, M., Franco, D., Brechot, C., 1995. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 21, 313-321.
- Patient, R., Hourieux, C., Roingeard, P., 2009. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cellular microbiology* 11, 1561-1570.
- Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., Roingeard, P., 2007. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *Journal of virology* 81, 3842-3851.
- Pellizzer, G., Ble, C., Zamperetti, N., Stroffolini, T., Upunda, G., Rapicetta, M., Chionne, P., Villano, U., Fabris, P., de Lalla, F., 1994. Serological survey of hepatitis B infection in Tanzania. *Public health* 108, 427-431.
- Philipp, T., Durazzo, M., Trautwein, C., Alex, B., Straub, P., Lamb, J.G., Johnson, E.F., Tukey, R.H., Manns, M.P., 1994. Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D. *Lancet* 344, 578-581.
- Pol, S., 2006. [Natural history of hepatitis B infection]. *Presse Med* 35, 308-316.
- Pourkarim, M.R., Amini-Bavil-Olyaei, S., Lemey, P., Maes, P., Van Ranst, M., 2010. Are hepatitis B virus "subgenotypes" defined accurately? *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 47, 356-360.
- Pourkarim, M.R., Amini-Bavil-Olyaei, S., Lemey, P., Maes, P., Van Ranst, M., 2011. HBV subgenotype misclassification expands quasi-subgenotype A3. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 947-949.
- Pourquier, P., Jensen, A.D., Gong, S.S., Pommier, Y., Rogler, C.E., 1999. Human DNA topoisomerase I-mediated cleavage and recombination of duck hepatitis B virus DNA in vitro. *Nucleic acids research* 27, 1919-1925.
- Quintero, A., Martinez, D., Alarcon De Noya, B., Costagliola, A., Urbina, L., Gonzalez, N., Liprandi, F., Castro De Guerra, D., Pujol, F.H., 2002. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Afro-Venezuelan populations. *Archives of virology* 147, 1829-1836.
- Quintero, A., Uzcategui, N., Loureiro, C.L., Villegas, L., Illarramendi, X., Guevara, M.E., Ludert, J.E., Blitz, L., Liprandi, F., Pujol, F.H., 2001. Hepatitis delta virus genotypes I and III circulate associated with hepatitis B virus genotype F In Venezuela. *Journal of medical virology* 64, 356-359.
- Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A., Kann, M., 2003. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9849-9854.

- Radjef, N., Gordien, E., Ivaniushina, V., Gault, E., Anais, P., Drugan, T., Trinchet, J.C., Roulot, D., Tamby, M., Milinkovitch, M.C., Deny, P., 2004. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *Journal of virology* 78, 2537-2544.
- Reigadas, S., Schrive, M.H., Aurillac-Lavignolle, V., Fleury, H.J., 2009. Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood and plasma spots. *Journal of virological methods* 161, 177-180.
- Rizzetto, M., 1983. The delta agent. *Hepatology* 3, 729-737.
- Rizzetto, M., 2009. Hepatitis D: thirty years after. *Journal of hepatology* 50, 1043-1050.
- Rizzetto, M., Canese, M.G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F., Verme, G., 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 18, 997-1003.
- Rizzetto, M., Hoyer, B., Canese, M.G., Shih, J.W., Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1980. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 6124-6128.
- Roche, B., Feray, C., Gigou, M., Roque-Afonso, A.M., Arulnaden, J.L., Delvart, V., Dussaix, E., Guettier, C., Bismuth, H., Samuel, D., 2003. HBV DNA persistence 10 years after liver transplantation despite successful anti-HBS passive immunoprophylaxis. *Hepatology* 38, 86-95.
- Roingard, P., Romet-Lemonne, J.L., Leturcq, D., Goudeau, A., Essex, M., 1990. Hepatitis B virus core antigen (HBc Ag) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect. *Virology* 179, 113-120.
- Roingard, P., Sankale, J.L., Dubois, F., Diouf, A., Bacha, A., Mboup, S., Goudeau, A., 1992. Infection due to hepatitis delta virus in Africa: report from Senegal and review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 14, 510-514.
- Romeo, R., Del Ninno, E., Rumi, M., Russo, A., Sangiovanni, A., de Franchis, R., Ronchi, G., Colombo, M., 2009. A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 136, 1629-1638.
- Roseman, A.M., Berriman, J.A., Wynne, S.A., Butler, P.J., Crowther, R.A., 2005. A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15821-15826.
- Ruff, T.A., Gertig, D.M., Otto, B.F., Gust, I.D., Sutanto, A., Soewarso, T.I., Kandun, N., Marschner, I.C., Maynard, J.E., 1995. Lombok Hepatitis B Model Immunization Project: toward universal infant hepatitis B immunization in Indonesia. *The Journal of infectious diseases* 171, 290-296.
- Rui, W.Z., Lo Baidy, B., N'Diaye, M., 1998. [Hepatitis B virus infection in the school milieu of Kiffa and Selibaby, Mauritania]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* 91, 247-248.
- Sakamoto, T., Tanaka, Y., Orito, E., Co, J., Clavio, J., Sugauchi, F., Ito, K., Ozasa, A., Quino, A., Ueda, R., Sollano, J., Mizokami, M., 2006. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines. *The Journal of general virology* 87, 1873-1882.
- Salisse, J., Sureau, C., 2009. A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus "a" determinant. *Journal of virology* 83, 9321-9328.
- Sanchez-Tapias, J.M., Costa, J., Mas, A., Bruguera, M., Rodes, J., 2002. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 123, 1848-1856.
- Saudy, N., Sugauchi, F., Tanaka, Y., Suzuki, S., Aal, A.A., Zaid, M.A., Agha, S., Mizokami, M., 2003. Genotypes and phylogenetic characterization of hepatitis B and delta viruses in Egypt. *Journal of medical virology* 70, 529-536.

- Schaefer, E., Koeppen, H., Wirth, S., 1993. Low level virus replication in infants with vertically transmitted fulminant hepatitis and their anti-HBe positive mothers. *European journal of pediatrics* 152, 581-584.
- Schaefer, S., 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World journal of gastroenterology* : WJG 13, 14-21.
- Seeger, C., Mason, W.S., 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 51-68.
- Shakil, A.O., Hadziyannis, S., Hoofnagle, J.H., Di Bisceglie, A.M., Gerin, J.L., Casey, J.L., 1997. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. *Virology* 234, 160-167.
- Sievert, W., Altraif, I., Razavi, H.A., Abdo, A., Ahmed, E.A., Alomair, A., Amarapurkar, D., Chen, C.H., Dou, X., El Khayat, H., Elshazly, M., Esmat, G., Guan, R., Han, K.H., Koike, K., Lagen, A., McCaughan, G., Mogawer, S., Monis, A., Nawaz, A., Piratvisuth, T., Sanai, F.M., Sharara, A.I., Sibbel, S., Sood, A., Suh, D.J., Wallace, C., Young, K., Negro, F., 2011. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 31 Suppl 2, 61-80.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D.G., Okamoto, H., Pawlotsky, J.M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I.T., Stuyver, L.J., Thiel, H.J., Viazov, S., Weiner, A.J., Widell, A., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.
- Sjogren, M.H., Colichon, A., 1991. Hepatitis B and delta hepatitis infection in Peru. *Progress in clinical and biological research* 364, 97-104.
- Skalsky, J.A., Joller-Jemelka, H.I., Bianchi, L., Knoblauch, M., 1996. [Role of hepatotropic viruses in liver pathology in Southwestern Cameroon]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift. Supplementum* 79, 36S-43S.
- Smedile, A., Bergmann, K.F., Baroudy, B.M., Wells, F.V., Purcell, R.H., Bonino, F., Rizzetto, M., Gerin, J.L., 1990. Riboprobe assay for HDV RNA: a sensitive method for the detection of the HDV genome in clinical serum samples. *Journal of medical virology* 30, 20-24.
- Smedile, A., Niro, M.G., Rizzetto, M., 2004. Detection of serum HDV RNA by RT-PCR. *Methods in molecular medicine* 95, 85-93.
- Smedile, A., Rizzetto, M., Gerin, J.L., 1994. Advances in hepatitis D virus biology and disease. *Progress in liver diseases* 12, 157-175.
- Soubiran, G., Le Bras, M., Marini, P., Sekou, H., 1987. High HBsAg and anti-delta carrier rate among asymptomatic Africans living on the campus of the University of Niamey, Niger. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 998-1000.
- Sprengel, R., Kaleta, E.F., Will, H., 1988. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *Journal of virology* 62, 3832-3839.
- Stoeckl, L., Funk, A., Kopitzki, A., Brandenburg, B., Oess, S., Will, H., Sirma, H., Hildt, E., 2006. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6730-6734.
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R.F., Rossau, R., 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *The Journal of general virology* 81, 67-74.
- Su, C.W., Huang, Y.H., Huo, T.I., Shih, H.H., Sheen, I.J., Chen, S.W., Lee, P.C., Lee, S.D., Wu, J.C., 2006. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology* 130, 1625-1635.



- Sugauchi, F., Orito, E., Ichida, T., Kato, H., Sakugawa, H., Kakumu, S., Ishida, T., Chutaputti, A., Lai, C.L., Ueda, R., Miyakawa, Y., Mizokami, M., 2002. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *Journal of virology* 76, 5985-5992.
- Sumi, H., Yokosuka, O., Seki, N., Arai, M., Imazeki, F., Kurihara, T., Kanda, T., Fukai, K., Kato, M., Saisho, H., 2003. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 37, 19-26.
- Summers, J., Smolec, J.M., Snyder, R., 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4533-4537.
- Sureau, C., Guerra, B., Lee, H., 1994. The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus. *Journal of virology* 68, 4063-4066.
- Sureau, C., Moriarty, A.M., Thornton, G.B., Lanford, R.E., 1992. Production of infectious hepatitis delta virus in vitro and neutralization with antibodies directed against hepatitis B virus pre-S antigens. *Journal of virology* 66, 1241-1245.
- Sureau, C., Taylor, J., Chao, M., Eichberg, J.W., Lanford, R.E., 1989. Cloned hepatitis delta virus cDNA is infectious in the chimpanzee. *Journal of virology* 63, 4292-4297.
- Suzuki, S., Sugauchi, F., Orito, E., Kato, H., Usuda, S., Siransy, L., Arita, I., Sakamoto, Y., Yoshihara, N., El-Gohary, A., Ueda, R., Mizokami, M., 2003. Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among HBV carriers in the Cote d'Ivoire: complete genome sequence and phylogenetic relatedness of HBV genotype E. *Journal of medical virology* 69, 459-465.
- Tabor, E., Gerety, R.J., Smallwood, L.A., Barker, L.F., 1977. Coincident hepatitis B surface antigen and antibodies of different subtypes in human serum. *Journal of immunology* 118, 369-370.
- Tagawa, M., Omata, M., Okuda, K., 1986. Appearance of viral RNA transcripts in the early stage of duck hepatitis B virus infection. *Virology* 152, 477-482.
- Tanaka, Y., Hasegawa, I., Kato, T., Orito, E., Hirashima, N., Acharya, S.K., Gish, R.G., Kramvis, A., Kew, M.C., Yoshihara, N., Shrestha, S.M., Khan, M., Miyakawa, Y., Mizokami, M., 2004. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology* 40, 747-755.
- Tatematsu, K., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Sugauchi, F., Mano, S., Maeshiro, T., Nakayoshi, T., Wakuta, M., Miyakawa, Y., Mizokami, M., 2009. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *Journal of virology* 83, 10538-10547.
- Taylor, J.M., 2003. Therapy for HDV! *Hepatology* 38, 1581-1582.
- Tognarelli, B., Coste, J., Pradines, C., Larrey, D., Michel, H., 1994. [Prevalence of hepatitis delta virus among asymptomatic HBs+ antigen blood donors and in HBs+ antigen hepatopathies in Mauritania]. *Gastroenterologie clinique et biologique* 18, 176.
- Tran, T.T., Trinh, T.N., Abe, K., 2008. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *Journal of virology* 82, 5657-5663.
- Urban, S., Schulze, A., Dandri, M., Petersen, J., 2010. The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of hepatology* 52, 282-284.
- Utama, A., Octavia, T.I., Dhenni, R., Miskad, U.A., Yusuf, I., Tai, S., 2009. Hepatitis B virus genotypes/subgenotypes in voluntary blood donors in Makassar, South Sulawesi, Indonesia. *Virology journal* 6, 128.

- Utsumi, T., Lusida, M.I., Yano, Y., Nugrahaputra, V.E., Amin, M., Juniastuti, Soetjipto, Hayashi, Y., Hotta, H., 2009. Complete genome sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates in Papua, Indonesia. *Journal of clinical microbiology* 47, 1842-1847.
- Uzunlimoglu, O., Yurdaydin, C., Cetinkaya, H., Bozkaya, H., Sahin, T., Colakoglu, S., Tankurt, E., Sarioglu, M., Ozenirler, S., Akkiz, H., Tozun, N., Degertekin, H., Okten, A., 2001. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey. *Digestive diseases and sciences* 46, 1022-1028.
- Vaudin, M., Wolstenholme, A.J., Tsiquaye, K.N., Zuckerman, A.J., Harrison, T.J., 1988. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *The Journal of general virology* 69 ( Pt 6), 1383-1389.
- Venegas, M., Munoz, G., Hurtado, C., Alvarez, L., Velasco, M., Villanueva, R.A., Brahm, J., 2008. Prevalence of hepatitis B virus genotypes in chronic carriers in Santiago, Chile. *Archives of virology* 153, 2129-2132.
- Viana, S., Parana, R., Moreira, R.C., Compri, A.P., Macedo, V., 2005. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 73, 808-814.
- Vray, M., Debonne, J.M., Sire, J.M., Tran, N., Chevalier, B., Plantier, J.C., Fall, F., Vernet, G., Simon, F., Mb, P.S., 2006. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Dakar, Senegal. *Journal of medical virology* 78, 329-334.
- Wai, C.T., Chu, C.J., Hussain, M., Lok, A.S., 2002. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 36, 1425-1430.
- Wang, H.W., Chen, P.J., Lee, C.Z., Wu, H.L., Chen, D.S., 1994. Packaging of hepatitis delta virus RNA via the RNA-binding domain of hepatitis delta antigens: different roles for the small and large delta antigens. *Journal of virology* 68, 6363-6371.
- Wang, K.S., Choo, Q.L., Weiner, A.J., Ou, J.H., Najarian, R.C., Thayer, R.M., Mullenbach, G.T., Denniston, K.J., Gerin, J.L., Houghton, M., 1986. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature* 323, 508-514.
- Wang, W.L., London, W.T., Lega, L., Feitelson, M.A., 1991. HBxAg in the liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 14, 29-37.
- Wang, Z., Liu, Z., Zeng, G., Wen, S., Qi, Y., Ma, S., Naoumov, N.V., Hou, J., 2005. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China. *The Journal of general virology* 86, 985-990.
- Warren, K.S., Heeney, J.L., Swan, R.A., Heriyanto, Verschoor, E.J., 1999. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *Journal of virology* 73, 7860-7865.
- Wedemeyer, H., Manns, M.P., 2010. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 7, 31-40.
- Werle-Lapostolle, B., Bowden, S., Locarnini, S., Wursthorn, K., Petersen, J., Lau, G., Trepo, C., Marcellin, P., Goodman, Z., Delaney, W.E.t., Xiong, S., Brosgart, C.L., Chen, S.S., Gibbs, C.S., Zoulim, F., 2004. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 126, 1750-1758.
- Wild, C.P., Montesano, R., 2009. A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer letters* 286, 22-28.
- Williams, V., Brichler, S., Radjef, N., Lebon, P., Goffard, A., Hober, D., Fagard, R., Kremsdorf, D., Deny, P., Gordien, E., 2009. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *The Journal of general virology* 90, 2759-2767.

- Wolters, L.M., van Nunen, A.B., Honkoop, P., Vossen, A.C., Niesters, H.G., Zondervan, P.E., de Man, R.A., 2000. Lamivudine-high dose interferon combination therapy for chronic hepatitis B patients co-infected with the hepatitis D virus. *Journal of viral hepatitis* 7, 428-434.
- Wong, D.K., Cheung, A.M., O'Rourke, K., Naylor, C.D., Detsky, A.S., Heathcote, J., 1993. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Annals of internal medicine* 119, 312-323.
- Wong, S.K., Lazinski, D.W., 2002. Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15118-15123.
- Wu, J.C., Chen, C.L., Hou, M.C., Chen, T.Z., Lee, S.D., Lo, K.J., 1994. Multiple viral infection as the most common cause of fulminant and subfulminant viral hepatitis in an area endemic for hepatitis B: application and limitations of the polymerase chain reaction. *Hepatology* 19, 836-840.
- Wu, J.C., Chen, T.Z., Huang, Y.S., Yen, F.S., Ting, L.T., Sheng, W.Y., Tsay, S.H., Lee, S.D., 1995a. Natural history of hepatitis D viral superinfection: significance of viremia detected by polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 108, 796-802.
- Wu, J.C., Choo, K.B., Chen, C.M., Chen, T.Z., Huo, T.I., Lee, S.D., 1995b. Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D. *Lancet* 346, 939-941.
- Wu, J.C., Huang, I.A., Huang, Y.H., Chen, J.Y., Sheen, I.J., 1999. Mixed genotypes infection with hepatitis D virus. *Journal of medical virology* 57, 64-67.
- Xia, Y.P., Lai, M.M., 1992. Oligomerization of hepatitis delta antigen is required for both the trans-activating and trans-dominant inhibitory activities of the delta antigen. *Journal of virology* 66, 6641-6648.
- Xia, Y.P., Yeh, C.T., Ou, J.H., Lai, M.M., 1992. Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex. *Journal of virology* 66, 914-921.
- Yamashiro, T., Nagayama, K., Enomoto, N., Watanabe, H., Miyagi, T., Nakasone, H., Sakugawa, H., Watanabe, M., 2004. Quantitation of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction--and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. *The Journal of infectious diseases* 189, 1151-1157.
- Yang, J., Xing, K., Deng, R., Wang, J., Wang, X., 2006. Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing. *The Journal of general virology* 87, 2203-2215.
- Yeo, W., Johnson, P.J., 2006. Diagnosis, prevention and management of hepatitis B virus reactivation during anticancer therapy. *Hepatology* 43, 209-220.
- Yim, H.J., Lok, A.S., 2006. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 43, S173-181.
- Yurdaydin, C., Bozkaya, H., Gurel, S., Tillmann, H.L., Aslan, N., Okcu-Heper, A., Erden, E., Yalcin, K., Iliman, N., Uzunalimoglu, O., Manns, M.P., Bozdayi, A.M., 2002. Famciclovir treatment of chronic delta hepatitis. *Journal of hepatology* 37, 266-271.
- Zaki, H., Darmstadt, G.L., Baten, A., Ahsan, C.R., Saha, S.K., 2003. Seroepidemiology of hepatitis B and delta virus infections in Bangladesh. *Journal of tropical pediatrics* 49, 371-374.
- Zauli, D., Fusconi, M., Crespi, C., Bianchi, F.B., Craxi, A., Pisi, E., 1984. Close association between basal cell layer antibodies and hepatitis B virus-associated chronic delta infection. *Hepatology* 4, 1103-1106.
- Zhang, X., Zoulim, F., Habersetzer, F., Xiong, S., Trepo, C., 1996a. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. *Journal of medical virology* 48, 8-16.

Zhang, Y.Y., Tsega, E., Hansson, B.G., 1996b. Phylogenetic analysis of hepatitis D viruses indicating a new genotype I subgroup among African isolates. *Journal of clinical microbiology* 34, 3023-3030.

Zhaohui, S., Wenling, Z., Bao, Z., Rong, S., Wenli, M., 2004. Microarrays for the detection of HBV and HDV. *Journal of biochemistry and molecular biology* 37, 546-551.

Zhu, Y., Yamamoto, T., Cullen, J., Saputelli, J., Aldrich, C.E., Miller, D.S., Litwin, S., Furman, P.A., Jilbert, A.R., Mason, W.S., 2001. Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *Journal of virology* 75, 311-322.

Zoulim, F., Saputelli, J., Seeger, C., 1994. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *Journal of virology* 68, 2026-2030.

## 5 Articles et posters

## Impact of Hepatitis B and Delta Viruses Coinfection on Liver Disease in Mauritania

**Wael Mansour<sup>1,2</sup>, Abdellahi Ould Amar<sup>3</sup>, Mariama Abdou Chekaraou<sup>4</sup>, Mohamed Ayé<sup>3</sup>, Frédéric Le Gal<sup>4</sup>, Lô Baïdy<sup>5</sup>, Pascal Veillon<sup>1,2</sup>, Alexandra Ducancelle<sup>1</sup>, Emmanuel Gordien<sup>4</sup>, Paul Cales<sup>2,6</sup>, Françoise Lunel-Fabiani<sup>1,2</sup>**

1. Virology Laboratory, CHU Angers, Angers, France.
2. HIFIH Laboratory, Faculty of medicine, University of Angers, France
3. Hepatology-Gastroenterology Department, Nouakchott National Hospital, Nouakchott, Mauritania.
4. Virology Laboratory, Avicenne Hospital, APHP, Bobigny, associated to French national Reference Center for Hepatitis virus B, C and Delta, France.
5. Public Health National Institute, Nouakchott, Mauritania
6. Hepatology – Gastroenterology Department, CHU Angers, France.

### INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection is a global health problem, and over 350 million people around the world are chronic carriers of the virus. Hepatitis Delta virus (HDV) is a defective RNA virus that requires hepatitis B virus for its assembly and transmission. It has been estimated that approximately 5-20% of the global HBsAg carriers are also coinfecting with HDV, leading to a total of **15–20 million HDV carriers worldwide**. In spite of the dramatic decline in the prevalence of HDV over the past decade, it is still endemic in many regions as in sub-Saharan Africa. Many studies have demonstrated that co-infection or super-infection with HDV may account for severe acute or chronic liver diseases which progress more rapidly to cirrhosis than mono-infection with HBV. In this study, we tried to evaluate the impact of HDV on the severity of hepatitis using non-invasive methods. We compared B versus B+D hepatitis patients using physical examination, laboratory tests including non-invasive score for determination of liver fibrosis: **FibroMeter<sup>®</sup> (FM)**.

### PATIENTS AND METHODS

**Patients:**

- A transversal study including 300 consecutive HBsAg positive patients was performed at Hepato-Gastroenterology Department of the Nouakchott National Hospital (CHN), Mauritania between February and October 2009.
- Patients were excluded if they had been previously tested positive for antibody to hepatitis C virus or human immunodeficiency virus; had evidence of metabolic or autoimmune liver disease; alcohol intake >60 g/day.
- Each subject gave written informed consent before sample collection. The subjects were also interviewed for collection of data such as age, polygamy, number of children, ethnic, educational level (according to the Mauritanian Ministry of Education levels), family income, nationality.

**Methods:**

- Hepatitis B surface antigen (AgHBs) was tested using ELISA technique (AxSYM-Abbott®) in Mauritania.
- Hepatitis Delta antibodies (Ab) (IgG, IgM), AbHBe and AgHBe levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (Diasorin®) in all patients. HCV infection was screened by EIA anti-HCV tests (Monalisa™ HCV Ag-Ab Ultra, Bio-Rad®).
- HBV-DNA and HDV-RNA extraction was performed using the automate NucliSENS Easy Mag® platform (BioMerieux) according to the manufacturer's instructions. HBV-DNA was measured by a quantitative assay NucliSENS EasyQ® platform (BioMerieux).
- FibroMeter (BLS, Angers, France): The FibroMeter virus based on an algorithm combining the α2-macroglobulin, urea, hyaluronate, AST, TP, platelets and age. The FibroMeter is the only test that allows quantification of fibrosis by estimating the area of fibrosis in viral hepatitis. This measure expresses the percentage of liver fibrosis. InfaMeter is intended to grade necroinflammatory activity.

FibroMeter	0	0.24	0.37	0.62	0.83	0.98	1
WIS							
F METAVIR	0/1	1	1/2	2/3	3/4	4	

- The natural history of hepatitis was evaluated using the non-linear regression of Lowess for liver lesions as a function of age. The relations among demographic and virological variables were analysed by univariate and multivariate analysis.

### RESULTS

- The general population characteristics were: (See Table)
  - Mean age 36±12 years, 184 men/116 women (51.3%-28.7%),
  - Stages F<sub>3/4</sub> Metavir: F0/1: 25.5%, F1: 16.2%, F1/2: 23.1%, F2/3: 14.8%, F3/4: 11.4%, F4: 9.0%;
  - Grades AIM (Activity InfaMeter) Metavir A0/1: 26.4%, A1/2: 62.0%, A2/3: 11.5%;
  - Antibodies anti HDV: 33.2%.

- The population anti-HDV Ab negative vs. anti-HDV Ab positive characteristics were: (See Table)
  - Mean age **33±11** versus **41±12** years ( $p < 10^{-3}$ ),
  - **FM score F: 0.40±0.25** versus **0.70±0.28** ( $p < 10^{-3}$ ),
  - IM (InfaMeter) score: **0.38±0.18** versus **0.57±0.22** ( $p < 10^{-3}$ ) (Figure-1),
  - Severe fibrosis: **6.8%** versus **47.4%** ( $p < 10^{-3}$ ), cirrhosis: **4.2%** versus **18.6%** ( $p < 10^{-3}$ ) (Figure-2).
  - The activity and fibrosis were significantly more elevated among patients with delta Ab positive ( $p < 10^{-3}$ ) than HDV ab negative patients independently of age. We found that the activity increases with age only in patients co-infected B-Delta and it was independently associated with HDV positive, AST, male sex and HBV viral load. Also fibrosis increased with age, and it was associated with: HDV positive, male sex, age, ALT levels and HBV viral load.

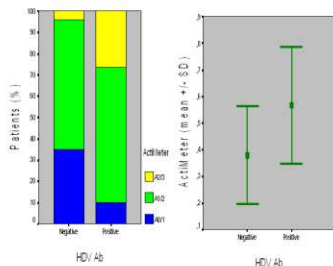


Figure-1 Relation between Activity grade (AIM) Metavir and HDV

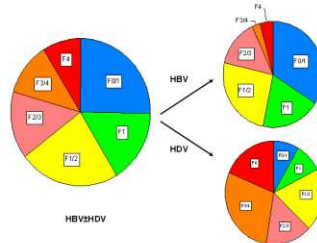


Figure-2 comparison of populations HBV, HBV+HDV

Table Comparison of population HBV vs. HBV+HDV

	General population	Ab anti-HDV negative	Ab anti-HDV positive	P
Number of patients	300	199	99	-
Age (mean: SD)	36:12	33:11	41:12	$< 10^{-3}$
Sex (% men)	61.3	58.8	66.7	0.189
FibroMeter F (mean: SD)	0.50:0.30	0.40:0.25	0.70:0.28	$< 10^{-3}$
Score F <sub>3/4</sub> Metavir	1.8:1.2	1.4:0.9	2.6:1.2	$< 10^{-3}$
Stades F <sub>3/4</sub> Metavir :				$< 10^{-3}$
F0/1	25.5	34.0	8.2	
F1	16.2	19.4	9.3	
F1/2	23.1	25.1	19.6	
F2/3	14.8	14.7	15.5	
F3/4	11.4	2.6	28.9	
F4	9.0	4.2	18.6	
Score A <sub>3/4</sub> Metavir	0.44:0.21	0.38:0.18	0.57:0.22	$< 10^{-3}$
Grades A <sub>3/4</sub> Metavir :				$< 10^{-3}$
A0/1	26.4	24.9	10.2	
A1/2	62.0	61.0	63.3	
A2/3	11.5	4.1	26.5	

### CONCLUSION

Hepatitis Delta is a major health problem in Mauritania. It occurs in older patients and leads to more severe liver disease than chronic HBV mono-infection. The severity of chronic hepatitis delta, the frequency of cirrhosis and their rapid evolution justify the screening for HDV in all patients with chronic HBV, especially in Africa. These results are the first step of a large study coordinated by ANRS-France to evaluate the natural history of B+D hepatitis in Mauritania.

**Acknowledgements:** We thank **Abbott®**, **Diasorin®** and **BioMerieux®** for their support to achieve this work.

poster.1

**Article:**

**Resolution of Chronic Hepatitis Delta after 1 year of combined therapy with Pegylated Interferon, Tenofovir and Emtricitabine.**

W. Mansour, A. Ducancelle, F. Le Gal, A. Pivert, H. Le Guillou-Guillemette, P. Calés, E. Gordien, F. Lunel. *Journal of Clinical Virology*. 2010; 47(1): 97-99.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jcv](http://www.elsevier.com/locate/jcv)

## Case report

## Resolution of chronic hepatitis Delta after 1 year of combined therapy with pegylated interferon, tenofovir and emtricitabine

Wael Mansour<sup>a,b</sup>, Alexandra Ducancelle<sup>a,b</sup>, Frédéric Le Gal<sup>c</sup>, Hélène Le Guillou-Guillemette<sup>a,b</sup>, Pierre Abgueuen<sup>d</sup>, Adeline Pivert<sup>a,b</sup>, Paul Calès<sup>a,e</sup>, Emmanuel Gordien<sup>c</sup>, Françoise Lunel<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Laboratoire HIFH UPRES EA 3859, Faculté de Médecine d'Angers, France<sup>b</sup> Laboratoire de virologie, CHU Angers, 4, rue Larrey 49933, Angers cedex 9, France<sup>c</sup> Laboratoire de virologie, CH&U Avicenne, associé au CNR des hépatites B, C et Delta, 125, boulevard de Stalingrad 93009 Bobigny cedex, France<sup>d</sup> Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU, Angers, 4, rue Larrey 49933, Angers cedex 9, France<sup>e</sup> Service d'Hépatogastroentérologie, CHU, Angers, 4, rue Larrey 49933, Angers cedex 9, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 June 2009

Received in revised form

22 September 2009

Accepted 24 September 2009

## Keywords:

Chronic hepatitis Delta

Pegylated interferon

Tenofovir disoproxil fumarate

Seroconversion anti-HBs

## ABSTRACT

**Background:** Hepatitis Delta virus (HDV) Infection has a worldwide distribution, with approximately 20 millions infected persons. Interferon (IFN) is the only approved drug for the treatment of HDV infection which is still a difficult to treat disease.

**Objectives:** To report a successful treatment of a patient with a chronic severe hepatitis Delta using combination therapy with Pegylated interferon (PegIFN), Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) and Emtricitabine (FTC).

**Study Design:** The patient, a 47 years -old male patient, originating from Dagestan (East Asia), suffered of chronic hepatitis Delta infection. The patient was HBsAg, HBeAg, and anti-Delta Ab (IgG) positive. Serum HBV-DNA level was elevated (more than 9 log<sub>10</sub> IU/mL). Serum HDV-RNA level was up to 5.6 log (copies/ml). Genotypes HBV/D and HDV-1 were demonstrated. The liver histology revealed chronic active hepatitis (Metavir score: A2F2).

The treatment was started with PegIFN (180 µg/week) for two months and then TDF (300 mg/day) (combined later with FTC) was added.

**Results:** Sustained response was obtained after 10 months of treatment and was accompanied by the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen with seroconversion to anti-HBs.

**Conclusion:** This case report suggests that Delta infection may co-exist with high replicative HBV infection and that combination therapy with PegIFN and nucleoside/tide analogues seems to be more effective than IFN alone. Given that only a single case is reported, further studies including more patients are warranted.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Hepatitis Delta antigen was discovered in 1977 by Rizetto et al. in patients with hepatitis B virus (HBV) infection and advanced liver disease.<sup>1</sup> HBV infection is a global health problem with approximately 350–500 million cases of chronic infection worldwide. An estimated 5–20% of HBV-infected patients are also infected with hepatitis Delta virus (HDV).<sup>2</sup> HBV and HDV are classified into eight genotypes, respectively A to H and 1–8. Many studies have demonstrated that co-infection or super-infection with HDV may account for severe acute or chronic liver diseases that progress more rapidly to cirrhosis and to hepatocarcinoma (compared to HBV mono-

infection).<sup>3</sup> HDV infection is difficult to treat. To date, interferon (IFN) is the only approved drug and generally less than 1/3 of the treated patients show a sustained virological response with clearance of serum HDV RNA.<sup>4</sup>

We describe here the successful treatment of a patient with chronic severe hepatitis D using combination therapy with pegylated interferon (PegIFN), tenofovir disoproxil fumarate (TDF) and emtricitabine (FTC).

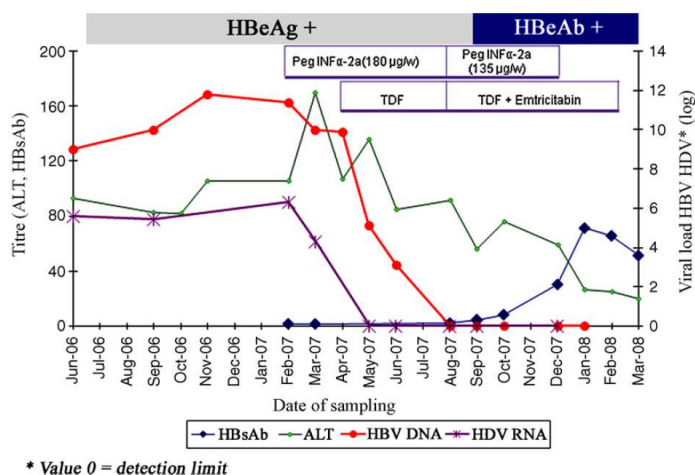
## 2. Case report

In April 2006, a 47-year-old male patient, originating from Dagestan (East Asia), was referred to the Department of Gastroenterology and Hepatology in Angers University Hospital. He was positive for hepatitis B surface (HBsAg) and e antigen (HBeAg) and had elevated alanine aminotransferase and high HBV DNA levels (110 million IU/mL).

\* Corresponding author at: Laboratory of Virology, Hospital of Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France. Tel.: +33 2 41 35 54 93; fax: +33 2 41 35 41 64.

E-mail address: [FrLunel-Fabiani@chu-angers.fr](mailto:FrLunel-Fabiani@chu-angers.fr) (F. Lunel).





**Fig. 1.** Levels of hepatitis B virus (HBV) DNA, hepatitis Delta virus (HDV) RNA, alanine aminotransferase levels (ALT) and anti-HBs antibodies (HBsAb) in serum during treatment. Undetectable HBV DNA level was demonstrated at month 7 of therapy (August 2007). After 10 months of treatment, increasing levels of anti-HBs antibodies were detectable (up to 71 mIU/ml).

In June 2003, the patient presented an episode of jaundice. Several weeks earlier he had received dental care. He was then hospitalized and laboratory data enabled the diagnosis of HBV infection. However, data were not available for viral replication markers or for possible HDV co-infection. Upon his arrival in our department in June 2006, physical examination showed no jaundice, ascites, leg oedema or liver or spleen enlargement. The following serological, biological and molecular analyses were performed: human immunodeficiency virus (HIV) markers, hepatitis B surface antigen (HBsAg), anti-HBs antibodies (HBsAb) (AxSYM-Abbott), hepatitis B e antigen (HBeAg), anti-HBe antibodies (HBeAb), anti-HBc IgM antibodies (Vidas-bioMerieux), and hepatitis Delta antibodies (IgG, IgM) (Diasorin). Detection and quantification of HBV DNA were performed using Cobas HBV Monitor (Roche Diagnostics) and real-time PCR (Abbott Real Time HBV, Abbott Molecular Diagnostics). HDV RNA was detected and quantified by real-time PCR as previously described (sensitivity threshold  $\approx 100$  copies/mL).<sup>5</sup> These analyses revealed a highly concomitant replicative HBV and HDV infection with more than  $9 \log$  IU/mL of HBV DNA and up to  $5.6 \log$  (copies/mL) of HDV RNA (Fig. 1). The genotypes of the infecting strains determined by phylogenetic analyses of preS1 and the R0 amplicon sequences for HBV and HDV respectively were HBV/D and HDV-1.<sup>6</sup> Almost all biological tests were within normal values. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase levels (ALT) were respectively  $1.14 \times N$  and  $1.6 \times N$ , and prothrombin time was about 78%. The patient was anti-HIV Ab negative.

Biopsies and non-invasive tests for liver fibrosis assessment, i.e. Elastometry (FibroScan®, Echosens, Paris, France) and FibroMeter® (BLS, Angers, France) were also performed and showed chronic active hepatitis with moderate fibrosis classified F2.

In February 2007, a 2-month course of treatment with pegylated interferon-alpha-2a (180 µg/week) (Pegasys, Roche) was initiated. In April no significant decrease of HBV DNA levels was obtained and HDV RNA remained detectable (Fig. 1). Because of this poor response, tenofovir disoproxil fumarate (TDF) (Viread, Gilead) (300 mg/day) was added to the PegIFN regimen. Under this combination therapy, HBV DNA decreased significantly ( $\Delta = 7 \log$ ), and HDV RNA became undetectable. In August, because of side effects (white blood cells = 2.63 giga/L, platelets = 113 giga/L), the PegIFN dose was reduced to 135 µg/week and emtricitabine (FTC) (Tru-

vada, Gilead) was introduced. This tritherapy was administered for four additional months, up to February 2008, and led to complete resolution of the HBV–HDV infection. In summary (Fig. 1), at baseline, laboratory tests found AST at 57 U/L and ALT at 125 U/L. HBeAg was positive. The HBV DNA level measured by the Cobas HBV Monitor test was  $11.8 \log$  IU/mL. In March 2007, the patient presented an ALT peak (170 U/L) (week 4 of treatment). HBV DNA became undetectable at month 7 of therapy (August 2007). One month later, HBsAg and HBeAg became negative and anti-HBe seroconversion occurred. After 10 months of treatment, increasing levels of anti-HBs antibodies were detectable (up to 71 mIU/ml) (Fig. 1). One year after the end of treatment, the patient remained HBV DNA, HBsAg and HDV RNA negative.

### 3. Discussion

We describe here the complete resolution of a chronic B-D infection in a patient with a particular clinical and serological presentation, who received combination therapy comprising PegIFN, TDF and FTC, and 2 years of follow-up. One main feature observed in the clinical presentation of this patient was the high concomitant HBV (more than  $11 \log$  IU/mL) and HDV (around  $6 \log$  copies/mL) replication. It is generally admitted (and has been recently demonstrated) that HDV inhibits the replication of HBV.<sup>7</sup> Host factors and/or viral factors may be involved. Our patient was from Dagestan (East Asia, close to Turkey), where no data are available concerning the prevalence and molecular epidemiology of HBV and HDV infection. Our patient was infected with HBV/D and HDV-1 strains, which are the main genotypes found in Turkey.<sup>8</sup> We are currently preparing a manuscript describing such clinical and virological presentations in patients originating from this country.

In chronic HBV infections, the ideal treatment goal is the total eradication of HBV. To date, the best indicators for this are the clearance of HBsAg, with or without the development of anti-HBsAg antibodies (anti-HBs), and the absence of detectable serum HBV DNA using sensitive assays. In our case, after less than 1 year of treatment, this goal was achieved.

To date, IFN alpha is the only licensed drug for the treatment of HDV infection. It is administered at high doses and for prolonged courses. A long-term follow-up study by Farci et al. provided evidence that high doses of IFN significantly improved the long-term

clinical outcome and survival of patients with chronic hepatitis D, even in the presence of initial cirrhosis.<sup>9</sup> However, relapses are frequently observed at the end of the treatment and complete resolution of B and Delta hepatitis has been reported in only a few cases.<sup>9,10</sup>

Although no data are available on the efficacy of TDF on HDV, our study demonstrates a potential efficacy of this drug. The effect of suppression of HBsAg by TDF demonstrated by Van Bommel may provide an explanation for the efficacy of TDF on CHD.<sup>11</sup>

In our study, an approximately 1-year course of tritherapy associating PegIFN, TDF and FTC was efficacious, as illustrated by negativation of HBV and HDV virological tests and complete patient recovery from both infections. However, it is not clear whether FTC treatment, added because of the interferon dose reduction, accelerated and/or increased the viral effect of TDF, since the dramatic decline of HBV/HDV was obtained with TDF + PegIFN. Finally, the activity of the combined therapy may be explained by a partial or total eradication of the HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) pool. In fact, it is not clear whether HBV cccDNA was completely eliminated; it may be that it continued to be present in low copy number. The difficulty in treating HBV infection and clearing HBsAg is thought to be related to the persistence of HBV in the hepatocyte nucleus in its cccDNA form. Recent studies showed that adefovir, lamivudine and PegIFN decrease intrahepatic cccDNA, although this reduction is low.<sup>12</sup>

In conclusion, this case report suggests that Delta infection may co-exist with high replicative HBV infection. Given that only a single case is reported, there is insufficient information to suggest this type of combination therapy for the moment; further studies including more patients are warranted.

#### Conflict of interest

None.

#### Ethical approval

Not required.

#### Acknowledgement

This work was supported in part by a research grant from ANRS (French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis).

#### References

- Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, et al. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system delta/anti-delta associated to the hepatitis B virus in the liver and the serum of HBs-Ag carriers. *Gut* 1977;**18**:997–1003.
- Hsieh TH, Liu CJ, Chen DS, Chen PJ. Natural course and treatment of hepatitis D virus infection. *J Formos Med Assoc* 2006;**105**:869–81.
- Farci P. Delta hepatitis: an update. *J Hepatol* 2003;**39**:S212–9.
- Castelnau C, Le Gal F, Ripault MP, Gordien E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, et al. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology* 2006;**44**:728–35.
- Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, Hanslik T, Alloui C, Dény P, et al. 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. *J Clin Microbiol* 2005;**43**:2363–9.
- Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anaïs P, Drugan T, et al. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a Deltavirus genus of at least seven major clades. *J Virol* 2004;**78**:2537–44.
- Williams V, Brichler S, Radjef N, Lebon P, Goffard A, Hober D, et al. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J Gen Virol* 2009;**90**:2759–67.
- Bozdayi A, Aslan N, Bozdayi G, Türkyılmaz AR, Sengezer T, Wend U, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004;**149**:2115–29.
- Farci P, Roskams T, Chessa L, Peddis G, Mazzoleni AP, Scioscia R, et al. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2004;**126**:1740–9.
- Gozlan J, Lacombe K, Gault E, Raguin G, Girard PM. Complete cure of HBV-HDV co-infection after 24 weeks of combination therapy with pegylated interferon and ribavirin in a patient co-infected with HBV/HCV/HDV/HIV. *J Hepatol* 2009;**50**:432–4.
- Van Bömmel F, Wünsche T, Mauss S, Reinke P, Bergk A, Schürmann D, et al. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004;**40**:1421–5.
- Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, et al. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006;**44**:675–84.

## Annexes

### Annexe 1

#### **EXTRACTION ARN /ADN EN COLONNE QIAGEN :**

L'extraction des acides nucléiques (AN) est réalisée par le QIAamp MinElute Vacuum Virus Kit de la société QIAGEN qui utilise sur la capacité de fixation des AN de la silice. Le système d'aspiration sous vide permet de réaliser plus facilement et rapidement les différents lavages après fixation des AN.

*A réception du kit conserver les colonnes à +4°C*

*Allumer un bain marie à 56°C*

*Reconstitution de réactifs à l'ouverture :*

- QIAGEN protéase lyophilisée + 4.4ml de Protéase Resuspension Buffer (garder après utilisation à +4°C)

-Carrier RNA lyophilisé + 310µl de Buffer AVE Buffer (à aliquoter en 4 tubes de 60µl puis garder à -20°C)

- Buffer AW1 + 25ml d'Ethanol absolu

- Buffer AW2 + 30ml d'Ethanol absolu

*Prévoir un Témoin négatif H2O distillée à chaque série d'extraction.*

#### **Protocole :**

1- Tube d'extraction numéroté (numéro donné au patient) ajouter 37,5µl de QIAGEN Protéase reconstituée

2- Ajouter 250 µl de Sérum puis 250 µl de Buffer AL (additionné du Carrier / **Cf tableau**)

Echantillons	Vol. buffer AL (ml)	Vol. carrier RNA (µl)	Echantillons	Vol. buffer AL (ml)	Vol. carrier RNA (µl)
1	0.28	3.1	13	3.58	40
2	0.55	6.2	14	3.85	43.1
3	0.83	9.3	15	4.13	46.2
4	1.10	12.3	16	4.40	49.3
5	1.38	15.4	17	4.68	52.4
6	1.15	18.5	18	4.95	55.5
7	1.93	21.6	19	5.23	58.5
8	2.20	24.7	20	5.50	61.6
9	2.48	27.5	21	5.78	64.7
10	2.75	30.8	22	6.05	67.8
11	3.03	33.9	23	6.33	70.9
12	3.30	37.0	24	6.60	73.9

- 3-** Vortexer 15 secondes puis incuber 15mn à 56°C
- 4-** Centrifuger quelques secondes puis ajouter 300 µl d’Ethanol absolu
- 5-** Vortexer 15 secondes puis laisser 5mn à température ambiante
- 6-** Centrifuger quelques secondes puis transférer la totalité du volume dans la colonne (installer sur la base sous vide : 1/Vac connector,2/Colonne,3/Extension)
- 7-** Mettre le système sous vide (environ 600mbar). Lorsque tout le volume est passé au travers de la colonne, faire 3 lavages successifs :
  - 300µl de buffer AW1
  - 375µl de buffer AW2
  - 375µl d’Ethanol absolu
- 8-** Retirer la colonne du système sous vide et la placer dans le tube à fond rond et sans bouchon du kit
- 9-** Centrifuger à 14000rpm 3min à TA.
- 10-** Placer la colonne dans un tube eppendorf propre du Kit et ajouter 100µl de Buffer AVE
- 11-** Centrifuger à 14000rpm 1min à TA.
- 12-** Garder les tubes d’extraction à -80°C

## Annexe 2

### A. REACTION DE PCR semi nichée HBV:

La détermination de la séquence nucléotidique de la région *Pré-S1* du génome HBV a permis de caractériser par phylogénie le génotype HBV des souches analysées. L'amplification de cette région par la technique de PCR semi nichée a été effectuée dans les conditions suivantes :

#### Protocole :

Préparer le MIX 1 de PCR en pièce « PCR propre »

MIX 1 PCR	[STOCK]	[FINALE]	1 TUBE = 40µl
Eau distillée	Qsp75µl		25,8µl
Tampon 10X	10X	1X	5µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM	1,5mM	3 µl
dNTP	2,5mM	200µM	4µl
Amorce <i>PIS</i>	10pmol/µl	0,25pm/ µl	1µl
Amorce <i>SI-2AS</i>	10pmol/µl	0,25pm/ µl	1µl
TaqGold			0,2µl

Préparer le MIX 2 de PCR en pièce « PCR propre »

MIX 2 PCR	[STOCK]	[FINALE]	1 TUBE = 48µl
Eau distillée	Qsp75µl		33,8µl
Tampon 10X	10X	1X	5µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM	1,5mM	3 µl
dNTP	2,5mM	200µM	4µl
Amorce <i>PIS</i>	10pmol/µl	0,25pm/ µl	1µl
Amorce <i>P2AS</i>	10pmol/µl	0,25pm/ µl	1µl
TaqGold			0,2µl

*Amorces utilisées pour l'amplification semi nichée de la région Pré-S1*

Amorce	(position) séquence
--------	------------------------

<b>PIS</b>	(2817-2839) TCACCATATTCTTGGGAACAAGA
<b>SI-2AS</b>	(685-704) CGAACCACTGAACAAATGGC
<b>P2AS</b>	(61-80) TTCCTGAACTGGAGCCACCA

Distribuer 40µl du MIX 1 PCR dans des microtubes PCR et ajouter 10µl d'extrait ADN

Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme d'amplification

94°C, 10 minutes → **activation l'Ampli TaqGold**

40 cycles d'amplification :

94°C, 20 secondes → **dénaturation**

55°C, 20 secondes → **hybridation des amorces sens et anti-sens**

72°C, 1 minute → **polymérisation par l'Ampli TaqGold**

4°C , infini → **conservation des amplicons**

Distribuer 48µl du MIX 2 PCR dans des microtubes PCR et ajouter 2µl de la 1<sup>ère</sup> réaction de PCR

Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme d'amplification

95°C , 5 minutes → **activation l'Ampli TaqGold**

40 cycles d'amplification :

95°C, 45 secondes → **dénaturation**

57°C, 60 secondes → **hybridation des amorces sens et anti-sens**

72°C, 1 minute 30 → **polymérisation par l'Ampli TaqGold**

72°C , 7 minutes → **élongation finale**

4°C , infini → **conservation des amplicons**

Faire migrer les produits amplifiés dans un gel d'agarose de 1,3% à 1,6% coloré au bromure d'ethidium (BET) pendant 1 heures à 100volt.

## **B. REACTION DE PCR nichée HBV:**

Concernant l'amplification des autres fragments, nous avons d'abord procédé à l'amplification du génome complet (gunther et al, 1995) avant de faire une deuxième PCR avec les amorces du tableau ci-dessous selon la région considérée.

### *Amorces utilisées pour l'amplification nichée des différentes régions du génome HBV*

La préparation du mix se fait comme dans le cadre de la PCR semi nichée. Mais, les conditions de PCR varient en fonction de la région amplifiée et sont indiquées dans le tableau ci-dessous

95°C , 5 minutes → **activation l'Ampli TaqGold**

40 cycles d'amplification :

95°C, 30 secondes → **dénaturation**

X°C, 1 minute → **hybridation des amorces sens et anti-sens**

72°C, Y minute → **polymérisation par l'Ampli TaqGold**

72°C , 7 minutes → **élongation finale**

4°C , infini → **conservation des amplicons**

Définition des paramètres X et Y en fonction des régions amplifiées

Région	<b>X</b> (Température d'hybridation)	<b>Y</b> (Temps d'élongation)
<i>Pré/Pol</i>	51°C	1mn
<i>Pol</i>	47°C	1min
<i>Pol/X</i>	51°C	1min 30s
<i>X/PréC</i>	59°C	1min
<i>PréC</i>	60°C	1mn
<i>PréC/PréS</i>	56°C	1min30s

Faire migrer les produits amplifiés dans un gel d'agarose de 1,3% à 1,6% coloré au bromure d'ethidium (BET) pendant 1 heures à 100 volt.



## Annexe 3

### SYNTHESE DE L'ADNc

Cette rétro-transcription est réalisée en présence d'amorces hexanucléotidiques qui vont s'hybrider au hasard (random priming) à l'ARN delta et permettre ainsi la synthèse de l'ADNc par l'intermédiaire de la transcriptase inverse superscript II (RT) (Invitrogene)

Préparer de l'éthanol refroidi à - 20°C.

#### Protocole :

Préparer 2 MIX en pièce PCR propre

Les MIX se préparent dans un tube eppendorf stérile de 1,5 ml.

Allumer le CETUS se trouvant dans la pièce de biologie moléculaire.

#### **MIX 1 (10µl/tube)**

MIX 1	[STOCK]	[FINALE]	1 TUBE
dNTP	2,5mM	0,5mM	5 µl
Amorce RP*	10 pM /µl	0,4 pM	1 µl
Eau stérile	qsp 10 µl		4 µl

\*Random Primer (amorçage au hasard) : amorces de 8 nucléotides

- 1- Préparer des eppendorfs 0,5ml avec 10 µl du MIX 1 dans la pièce de biologie moléculaire déposer 5 µl d'ARN extraits précédemment
- 2- Dénaturer les ARN+MIX1 à **100°C pendant 5 mm.**
- 3- Congeler immédiatement dans l'éthanol refroidi à -20°C (afin de conserver les ARN dénaturés).
- 4- Centrifuger quelques sec pour faire retomber les gouttelettes.

#### **MIX 2 (10µl/tube)**

MIX 2	[STOCK]	[FINALE]	1 TUBE
Tampon 5X	5X	1 X	5 µl
DTT	100 mM	10mM	2,5 µl
Eau stérile	qsp 10 µl		1,385 µl
RNAsine	34,2 U/ µl	1 U /µl	0,615
Enzyme RT	200U/µl	100 U µl	0,5

- 5- Distribuer 10 µl de MIX 2 dans chaque tube préalablement dénaturé
- 6- Centrifuger quelques secondes
- 7- Disposer immédiatement les tubes dans le thermocycleur avec le protocole suivant:  
CYCLES: 45 min à 42 °c  
5 min à 94°C.
- 8- A cette étape, soit on fait directement la PCR, soit on congèle à -80°C les cDNA.

## Annexe 4

### REACTION DE PCR HDV QUALITATIVE:

#### Protocole :

Préparer le MIX de PCR en pièce « PCR propre »

MIX-PCR	[STOCK]	[FINALE]	1 TUBE = 75µl
Eau distillée	Qsp75µl		52,3µl
Tampon 10X	10X	1X	8µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM	1,5mM	4,8 µl
dNTP	2,5mM	200µM	5,4µl
Amorce sens	10pmol/µl	0,25pm/µl	2µl
Amorce antisens	10pmol/µl	0,25pm/µl	2µl
TaqGold			0,5µl

*Amorces utilisées pour l'amplification de la région R0 de l'ARN HDV*

Région	Amorce sens	Amorce antisens
<b>R0</b>	889s CATGCCGACCCGAAGAGGAAAG	1289as GAAGGAAAGGCCCTCGAGAACAAGA

Distribuer 75µl du MIX PCR dans des microtubes PCR et ajouter 5µl de la réaction de retrotranscription.

Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme d'amplification correspondant à la région à amplifier :

95°C , 10 minutes → **activation l'Ampli TaqGold**

45 cycles d'amplification :

95°C, 30 secondes → **dénaturation**

62°C, 30 secondes → **hybridation des amorces sens et anti-sens**

72°C, 45 secondes → **polymérisation par l'Ampli TaqGold**

72°C , 7 minutes → **élongation finale**

4°C , infini → **conservation des amplicons**

Faire migrer les produits amplifiés dans un gel d'agarose de 1,3% à 1,6% coloré au bromure d'éthidium (BET) pendant 1 heures à 100volt.

## Annexe 5

### REACTION DE SEQUENCAGE

La réaction de séquence utilisée est basée sur l'arrêt de polymérisation des fragments amplifiés par incorporation de didéoxynucléotides marqués par un fluorophore spécifique de chaque base : Kit « Big Dye Terminator » de la société Applied Biosystems.

#### Protocole :

##### **1. Purification des produits PCR** (microcon PCR50/Millipore)

- Déposer 400µl d'eau stérile en haut de la colonne
- Déposer le reste de produit amplifié
- Placer un tube collector 1,7ml sous la colonne et la centrifuger 10min à 3000g centrifugeuse de paillasse
- Eventuellement rincer 1 fois la colonne avec 300µl d'eau stérile en la centrifugeant 5min à 3000g
- Ajouter 20µl d'eau stérile en haut de la colonne
- Retourner la colonne et la centrifuger 3min à 3000g

##### **2. Réaction de séquençage** (Applied Biosystems/BigDye Terminator Version 3.1)

Les réactions des séquences effectuées lors de cette étude ont toutes été réalisées sur les 2 brins des produits amplifiés

Préparation du Mix sens et du Mix antisens

Mix de marquage	2µl / tube
Amorce sens ou antisens (à 10pmol/µl)	3,5µl /tube
Tampon 5X	4µl /tube
Eau stérile qsp 18µl/tube	8,5µl /tube

- Répartir ces mix à raison de 18µl / tube dans des microtubes 0,2ml en barette.
- Ajouter à chaque tube 2 µl d'ADN (environ 100ng) amplifié et purifié.
- Placer les tubes dans le thermocycleur

#### Programme réaction de séquence :

<b>10 sec 96°C</b>	
<b>5 sec 50°C</b>	<b>25 cycles</b>
<b>4 min 60°C</b>	
Storage	4°C

##### **3. Purification des produits de réaction de séquence**

Préparation d'une plaque de purification 96 puits

- Remplir avec du Sephadex G50-50 (Sigma Aldrich) les puits d'une plaque MultiScreen Column Loader, 45  $\mu$ L (ref : MACL09645/Millipore)
- Retourner cette plaque sur une plaque de filtration MultiScreen-HV Plate (ref :MAHVN4510/Millipore)
- Distribuer dans chaque puit 300  $\mu$ L d'eau distillée
- Disposer alors cette plaque sur une plaque plastique 96 puits classique vide en intercalant un joint plastique bleu entre les 2 plaques
- Centrifuger 5 min à 2700 rpm puis laisser reposer la plaque 3 heures à T°C ambiante
- Cette plaque de filtration peut alors être conservée 10 jours maximum à +4°C

#### Purification des produits de réaction de séquence

- Placer la plaque de filtration sur une nouvelle plaque 96 puits classique en y intercalant toujours le joint bleu
- Déposer les 20  $\mu$ L de produit de séquence dans chacun des puits de la plaque sans toucher le polymère
- Centrifuger 5 min à 2700 rpm puis récupérer dans des microtubes en barettes de huit, 10 $\mu$ L de purification présents dans les puits de la plaque inférieure
- Ajouter 10  $\mu$ L de formamide à chacun des microtubes contenant les purifications

#### **4. Migration des purifications de séquence sur ABI3100 - 4 capillaires (Applied Biosystems)**

## Annexe 6

### CLONAGE

Le clonage a été utilisé afin de confirmer la présence des souches recombinantes. Les produits PCR purifiés des régions *PréSI* et *X-PréC* de l'HBV des souches recombinantes ont été clonés dans un vecteur pCRII en utilisant le kit TOPO TA CLONING-pCRII (Invitrogen) puis le fragment inséré a été digéré, purifié et quantifié suivant le protocole suivant :

#### 1. Préparation de milieu LB agar en boîte de pétri

- Prendre un bécher que l'on peut fermer avec un coton
- Peser 32g de poudre LB-Agar pour 200 ml De milieu LB
- Chauffer au micro-ondes pendant plusieurs minutes jusqu'à ce que la solution devienne transparente.
- Refroidir à 55°C environ
- Ajouter l'antibiotique (ampicilline 50µg/ml final) + 3µl /150ml X-Gal (à 0,25g/ml)
- Devant la flamme, couler les boîtes (≈ 20 ml/boîte)
- Les laisser refroidir
- Enfin les conserver à +4°C à l'abri de la lumière

#### 2. Purification des produits PCR (kit microcon PCR50 / Millipore)

- Déposer 400µl d'H<sub>2</sub>O DEPC en haut de la colonne
- Déposer la totalité du produit amplifié
- Placer un tube collector 1,7ml sous la colonne et la centrifuger 10min à 3000g
- Ajouter 20µl d'H<sub>2</sub>O DEPC en haut de la colonne
- Retourner la colonne et la centrifuger 3min à 3000g (on récupère 20µl)

#### 3. Insertion de produits PCR dans le plasmide (vecteur pCRII-TOPO)

<b>Produits PCR après élongation et purification en microcon PCR50</b>	0,5 - 4 µl	Par réaction 2 µl
<b>Solution tampon</b>	1 µl	1 µl
<b>Eau stérile</b>	qsp 5 µl	1 µl
<b>TOPO vecteur</b>	1 µl	1 µl
<b>Total</b>	1 µl	1 µl

Bien mélanger et laisser à température ambiante pendant 5 min puis conserver dans la glace.  
(peut-être conservé à -20°C une nuit)

#### 4. Transformation chimique de bactéries *E. coli*

### Préparation des Boîtes LB :

- Mettre les boîtes de Pétri LB à 37°C pendant 30 min
- Préparer la plaque chauffante à 42°C
- Sortir les “ vials of one shot cells” dans la glace

### Transformation :

- Décongeler le milieu SOC (laisser à température ambiante)
- Ajouter 2 µl de TOPO cloning reaction dans chaque « vial TOP10 » de cellules (dans la glace)
- Incuber 30 min dans la glace
- Réaliser un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes
- Remettre immédiatement dans la glace
- Ajouter 250 µl de milieu SOC (avec cônes stériles et sous la flamme)
- Incuber en agitation horizontale (200 rpm) dans l'étuve à 37°C pendant 1H
- Pour chaque transformation, ensemencer 2 volumes différents 50 µl et 100 µl
- Laisser incuber toute la nuit

## **5. Analyse des transformants**

Les colonies blanches ou bleu clair sont celles qui ont incorporé le plasmide : en analyser environ 10 par réaction.

- Ajouter l'antibiotique (ampicilline 50 µg/ml) dans le milieu LB liquide
- Distribuer 4 ml de milieu LB dans des tubes en verre stérile
- Mettre une colonie dans chaque tube de LB à l'aide d'une pointe à filtre stérile
- Laisser incuber à 37°C toute la nuit sous agitation horizontale (200 rpm)
- Ré-inoculer ces 4ml de culture dans un nouveau tube en verre stérile contenant 200ml de LB
- Laisser incuber de nouveau à 37°C toute la nuit sous agitation horizontale (200 rpm)

## **6. Extraction du plasmide (kit MidiPrep / Qiagen)**

- Centrifuger les 200ml de culture bactérienne à 6000g pendant 15min à 4°C
- Resuspendre le culot bactérien dans 4ml de solution P1 Qiagen (resuspension solution)
- Ajouter 16ml de solution P2 Qiagen (solution de lyse)
- Incuber 5 min à T°C ambiante
- Diviser le volume en 4 x 4ml dans des corning de 15ml
- Ajouter à chaque corning 4 ml de solution P3 Qiagen (solution de neutralisation)
- Mélanger par retournement puis verser la totalité d'un tube dans une cartouche filtre du kit (x4)
- Incuber 10min à température ambiante et placer en dessous de la cartouche un tube collecteur
- Parallèlement, équilibrer le pH d'une colonne en ajoutant 4 ml de solution QTB
- Retirer le bouchon de la cartouche et ajouter le piston
- Filtrer le contenu de la cartouche dans la colonne « équilibrée »
- Attendre que le contenu passe à travers la colonne par gravité
- Laver 2 fois avec la solution QC et éluer avec 5 ml de solution QF
- Regrouper le volume des 4 tubes = 20ml
- Ajouter 1,4ml d'Isopropanol et vortexer
- Centrifuger 30 min à 15000 rpm à 4°C
- Eliminer le surnageant
- Rincer le culot avec 10ml d'éthanol à 70°C à -20°C

- Centrifuger 10 min à 15000 rpm à 4°C
- Jeter le surnageant
- Laisser sécher 30 min (sous la hotte, bouchon ouvert)
- Resuspendre le culot dans 300 µl d'eau stérile
- Congeler à -20°C

### 7. Mesure de la concentration de l'ADN plasmidique récupéré

Cette mesure effectuée par spectrophotométrie à 260nm a pour but de réaliser la digestion enzymatique dans les meilleures conditions (concentration d'enzyme).

### 8. Digestion enzymatique des fragments *PréS1* et *X-PréC* avec *EcoRI*

Digestion de 15µg de plasmide (soit 15 µl) dans un volume final de 50µl

<b>tampon 10X</b>	5 µL
<b><i>EcoRI</i> (1U/µg)</b>	15 µL
<b>H2O</b>	10 µL
<b>+ 15 µL de pCRII-<i>PréS1</i> ou pCRII-<i>X-PréC</i></b>	

- Au bain-marie au moins 2H30 à 37°C
- Migration sur gel d'agarose pour vérifier l'efficacité de la digestion
- Séquençage des plasmides avec les amorces universelles M13 (Invitrogen)