



ELSEVIER  
MASSON

Disponible en ligne sur [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Pathologie Biologie xxx (2008) xxx–xxx

PATHOLOGIE  
BIOLOGIE

<http://france.elsevier.com/direct/PATBIO/>

## Caractéristiques des souches virales responsables d'hépatites B chroniques en Algérie du Nord-Est

### Characteristics of hepatitis B viral strains in chronic carrier patients from North-East Algeria

F. Khelifa<sup>a</sup>, V. Thibault<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'hygiène de la Wilaya, institut Pasteur d'Algérie, cité Daksi, Constantine, Algérie

<sup>b</sup>Laboratoire de virologie, hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Assistance publique-Hôpitaux de Paris,  
83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Reçu le 30 juin 2008 ; accepté le 4 juillet 2008

#### Résumé

*But de l'étude.* – Le but était de préciser les caractéristiques des infections par le virus de l'hépatite B (VHB) dans une région du Nord-Est algérien. En effet, l'infection par le VHB reste un problème de santé public mondial et l'Algérie se trouve dans une région de prévalence intermédiaire. La connaissance de l'épidémiologie de cette infection est indispensable pour adapter au mieux la stratégie de prévention et de prise en charge thérapeutique.

*Matériels et méthodes.* – Nous avons étudié 75 patients du Nord-Est algérien porteurs chroniques du VHB. Les caractéristiques des souches de VHB ont été étudiées au moyen de tests sérologiques et par analyse phylogénique des gènes codant une partie des régions précore, HBs et polymérase.

*Résultats.* – L'âge médian des patients était de 35 ans et 80 % d'entre eux avaient des transaminases normales. Des lésions histologiques hépatiques ont été retrouvées chez 63 % de ceux qui ont bénéficié d'une ponction biopsie hépatique et 21 % avaient une cirrhose. La médiane de répllication virale était de 3,9 Log UI/ml et 87 % des patients avaient un profil sérologique de type mutant précore sans Ag HBe. Le génotype D était prédominant (93 %) suivi par le A (5 %) et un patient avait un génotype E. Le regroupement distinct des souches algériennes par rapport aux séquences caractérisées dans d'autres régions du monde semble indiquer un sous-type particulier dans le génotype D. Seules 16 % des souches ne possédaient aucune mutation en position 1762/1764 et 1896.

*Conclusions.* – Dans cette série originale de patients algériens porteurs chroniques du VHB, les particularités virologiques observées sont comparables à ce qui a été décrit dans d'autres pays du pourtour méditerranéen et soulèvent le problème de la prévention et de la prise en charge thérapeutique de l'hépatite B chronique en Algérie.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### Abstract

*Objective.* – The goal of the study was to determine the characteristics of chronic hepatitis B virus (HBV) infections in the north-east part of Algeria. Chronic HBV infection remains a global public health issue and Algeria is considered as an intermediate prevalence area. Improving our knowledge on the epidemiology of this infection is a prerequisite to adopt the best preventive and curative strategy.

*Material and methods.* – We have studied 75 chronic hepatitis B patients from north-east Algeria. The characteristics of HBV strains were determined by use of serological and molecular testing. Genes encoding part of the precore, the surface and the polymerase were sequenced and phylogenetically analyzed.

*Results.* – Median age of the patients was 35 years and 80% of them had normal transaminase level. Liver histological lesions were identified in 63% of the patients who benefited from a liver biopsy and 21% of them had cirrhosis. Median viral replication was 3.9 Log IU/ml and 87% of

\* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : [fouidikhelifa@yahoo.fr](mailto:fouidikhelifa@yahoo.fr) (F. Khelifa), [vincent.thibault@psl.aphp.fr](mailto:vincent.thibault@psl.aphp.fr) (V. Thibault).

patients had a “precore” mutant serological profile without HBe Ag. Genotype D was predominant (93%) followed by genotype A (5%) and E for one patient. Algerian strains clustered independently from other genotype D reference sequences, suggesting a possible new D subtype. Within the “precore” region, only 16% of the strains did not show any mutation at positions 1762/1764 and 1896.

**Conclusion.** – In this original set of patients from north Algeria, the virologic characteristics of HBV are comparable to what has been described in other Mediterranean countries. Our study raises several important aspects with regard to the prevention and treatment of chronic hepatitis B in Algeria.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Virus de l'hépatite B ; Génotype ; Mutants précore ; Polymérase ; Phylogénie

**Keywords:** Hepatitis B virus; Genotype; Precore mutants; Polymerase; Phylogeny

## 1. Introduction

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) reste un problème de santé public mondial. Il est estimé qu'environ deux milliards d'êtres humains ont été infectés par le VHB et qu'environ 350 millions sont porteurs chroniques du virus. Cette infection chronique est associée à un risque accru de développement de la cirrhose et du cancer primitif du foie.

Selon les données de l'OMS, l'Algérie est un pays considéré comme ayant une prévalence intermédiaire de l'hépatite B, estimée entre 2 et 7 %. Une étude locale de séroprévalence réalisée en 1998 avait d'ailleurs retrouvé un taux de portage de l'Ag HBs de 2,15 %. Dans la grande majorité des cas, le portage était découvert de façon fortuite lors d'un don du sang, d'un bilan préopératoire, prénuptial ou prénatal. Le nombre de cas intrafamiliaux élevé suggérait une transmission horizontale importante dans la population algérienne.

L'histoire naturelle de l'hépatite B chronique peut être schématiquement divisée en plusieurs phases. La première, phase d'immunotolérance, se caractérise habituellement par un niveau de répllication virale élevée (> 20 000 UI/mL) et la présence d'Ag HBe, marqueur indirect de la répllication virale. Suit alors la phase d'immuno-élimination durant laquelle la réponse immunitaire induit la sélection de souches virales particulières, un contrôle relatif de la répllication virale (< 20 000 UI/mL) et sur le plan physiopathologique des lésions hépatiques fibrosantes. C'est durant cette phase que les virus communément appelés « mutant précore » sont sélectionnés. En pratique diagnostique, le profil sérologique est caractérisé durant cette phase par une répllication virale modérée et l'absence d'Ag HBe détectable par les techniques sérologiques courantes. L'étude de ces souches indique qu'elles portent des mutations, soit dans la région promotrice du core (*core-promoter* [CP]) résultant en une diminution de la production de la protéine, soit dans le cadre de lecture de l'Ag HBe avec incorporation d'un codon stop qui élimine toute production de l'Ag [1]. Les mutations responsables de ce blocage de production de l'Ag HBe, imparfaitement dénommées « précore » ont été localisées en particulier dans le promoteur du core sur les bases 1762 et 1764 et en position 1896 dans le gène pré-C. D'autres mutations peuvent cependant être impliquées dans la perte de production d'Ag HBe. Ce processus de sélection conduisant à l'émergence de ces souches dépend de nombreux facteurs liés à l'hôte et au virus, en

particulier le génotype pour ce dernier. L'émergence de mutants « précore » est extrêmement fréquente et une étude française multicentrique récente indique que plus de 70 % des patients consultant pour une hépatite B chronique est infecté par ce type de virus [2]. Dans une minorité de cas, le portage chronique devient inactif avec une répllication virale à minima (< 2000 UI/mL), la présence d'anti-HBe et l'absence de lésion hépatique [3]. Plus rarement, la réponse immunitaire conduit à l'élimination de l'Ag HBs, voire à l'acquisition d'anti-HBs, classiquement décrit comme conférant un profil de guérison. Devant ces différents tableaux, il apparaît comme primordial d'avoir un maximum d'informations sur le profil sérologique et la répllication virale pour estimer le risque d'évolution de la maladie [4].

L'évolution génétique du VHB a conduit à l'émergence d'au moins huit génotypes principaux désignés par les lettres de A à H et caractérisés par une divergence de leurs séquences nucléotidiques d'au moins 8 % [5]. Selon la zone géographique considérée, la prévalence de chaque génotype sera différente. Alors que le génotype le plus prévalent en Afrique semble être le E, le pourtour méditerranéen est caractérisé par une prévalence importante de génotype D [6].

De nombreuses études ont souligné l'impact possible des génotypes et des mutations précore sur l'évolution de la maladie liée à l'infection par le VHB. Il faut cependant noter l'impact probablement important de l'épidémiologie dans ces études. En effet, le décours de la maladie est différent selon que l'on se contamine en bas âge ou plus tard dans la vie. L'âge de la contamination est très dépendant de la zone d'endémie et par conséquent des génotypes circulants dans ces régions géographiques ; il y a donc de multiples facteurs intercurrents dans l'histoire naturelle de la maladie [4].

L'évolution de l'hépatite chronique B étant largement influencée par les marqueurs viraux tels que la charge virale, les génotypes ou les mutations précore, nous avons réalisé une étude pour déterminer quelles étaient précisément les souches de VHB responsables d'hépatite B chronique dans notre région du Nord-Est algérien.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Patients

Il s'agit d'une étude prospective qui a porté sur 75 personnes consécutives résidant dans le Nord-Est algérien et qui ont été

adressées après dépistage d'un Ag HBs positif. Les critères d'inclusion étaient la positivité de l'Ag HBs depuis plus de six mois. Parmi ces patients, une seule personne était d'origine malienne et vivait en Algérie depuis six ans. Un consentement de participation a été sollicité et obtenu pour tous les participants à cette étude.

## 2.2. Statut clinique

Un dosage des transaminases (alanine-amino transférase [ALAT]) a été réalisé. Afin d'apprécier l'atteinte histologique, une ponction biopsie hépatique a été proposée lorsque les ALAT étaient à un taux supérieur à 1,5 fois la normale sur deux prélèvements successifs.

## 2.3. Recherche des marqueurs sérologiques

Les marqueurs sérologiques ont été recherchés sur l'automate AxSYM (ABBOTT, Rungis, France) par une méthode MEIA. Ceux-ci comprenaient : l'Ag HBs, les anticorps anti-HBs, l'Ag HBe, les anticorps anti-HBe, les anticorps anti-HBc totaux et IgM, les anticorps anti-VHC et les anticorps anti-VIH1 et 2.

Les anticorps antiviral de l'hépatite Delta totaux et IgM ont été recherchés par dosage immuno-enzymatique par une technique de compétition (Diasorin, Antony, France).

## 2.4. Quantification de l'ADN du VHB par PCR en temps réel

La réplication virale a été estimée par la quantification du génome du VHB par PCR en temps réel sur un automate Cobas Taqman après obtention des acides nucléiques sur un automate Ampliprep (Roche Diagnostics, Meylan, France). La gamme de quantification allait de 54 à 110 000 000 UI/ml avec une sensibilité de 12 UI/ml.

## 2.5. Détermination des génotypes et détection des mutations précoces et du promoteur basal du core

L'ADN du VHB a été obtenu à partir de 500 µl de plasma au moyen du système M2000sp (ABBOTT, Rungis, France) et resuspendu dans 70 µl de tampon. Deux amorces pol1m (5'-CCC TGC TCG TGT TACA GGC GG) et pol2m (5'-GTT GCG TCA GCA AAC ACT TGG CA) ont été utilisées pour amplifier un fragment de 968 pb codant une partie de la polymérase du VHB dont les domaines A à E. Les conditions opératoires étaient 94 °C pendant cinq minutes puis 39 cycles (94 °C, 45'' ; 52 °C, 45'' ; 72 °C, 60''). En cas d'absence d'amplification, une seconde PCR sur 2 µL du premier produit d'amplification était réalisée en utilisant les amorces internes pol3m (5'-GACTCGTGGTGGACTTCTCTCA) et pol4m (5'-GGC ATT AAA GCA GGA TAA CCA CAT TG) afin d'obtenir un fragment de 761 pb. Les conditions opératoires de cette seconde PCR étaient 94 °C pendant cinq minutes, puis 39 cycles (94 °C, 45'' ; 55 °C, 45'' ; 72 °C, 30'').

## 2.6. Fragment « Core »

Deux amorces C1609 (5'-GCA TGG AGA CCA CCG TGA ACG) et HBC2 (5'-TCT GCG AGG CGA GGG AGT TCT) ont été utilisées pour amplifier un fragment de 755 pb codant une partie de la protéine X et Core du VHB. Les conditions opératoires étaient 94 °C pendant cinq minutes puis 39 cycles (94 °C, 45'' ; 52 °C, 45'' ; 72 °C, 60''). En cas d'absence d'amplification, une seconde PCR sur 2 µL du premier produit d'amplification était réalisée en utilisant l'amorce interne R2 (5'-TCAGAAGGCCAAAACGAGAGTAACT) et à nouveau C1609 (5'-GGC ATT AAA GCA GGATAA CCA CAT TG) afin d'obtenir un court fragment de 315 pb incluant les principaux points de mutations précoces et promoteur du core. Les conditions opératoires de cette seconde PCR étaient 94 °C pendant cinq minutes, puis 39 cycles (94 °C, 45'' ; 55 °C, 45'' ; 72 °C, 30'').

## 2.7. Séquençage et analyse des produits de PCR

Le séquençage des produits de PCR purifiés sur colonne (Microcon YM100, Millipore) a été réalisé sur un séquenceur ABI 3100 (Applied Biosystems, Courtabœuf, France) au moyen de la trousse BigDye v3.0 Terminator sequencing kit (Applied Biosystems, Courtabœuf, France) selon les recommandations du fournisseur et au moyen des amorces d'amplification. L'analyse des électrophérogrammes obtenus a été réalisée au moyen du logiciel Seqscape v2.5 (Applied Biosystems, Courtabœuf, France). Les logiciels d'analyse de séquence Clustal et Genedoc ont été utilisés pour l'alignement des séquences.

Les génotypes ont été déterminés par analyse phylogénétique en comparant les séquences obtenues aux séquences de référence correspondant aux génotypes déjà décrits dans Genbank au moyen du logiciel Méga 4 [7]. Les mutations des différents gènes ont été recherchées sur les alignements correspondants.

## 2.8. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée au moyen du logiciel StatView v5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Le khi-carré et le test de Mann-Whitney ont été utilisés pour évaluer la signification statistique de la différence entre les groupes. Des valeurs de *p* inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

## 3. Résultats

### 3.1. Caractéristiques des patients étudiés

Les principales caractéristiques des patients sont résumées dans le **Tableau 1**. Seuls 13 % des patients étaient Ag HBe positif et la majorité avait un profil sérologique sans Ag HBe avec présence concomitante d'Ac anti-HBe. Parmi ces derniers, les sujets masculins étaient plus nombreux (43 hommes [66 %] pour 22 femmes [24 %]), sans atteindre une signification

Tableau 1  
Caractéristiques des patients

| Caractéristiques       | Ag HBe (+) | Ag HBe (-) | p        |
|------------------------|------------|------------|----------|
| Effectifs              | 10         | 65         |          |
| Hommes/femmes          | 5/5        | 43/22      | NS       |
| Âges moyens (extrêmes) | 16 (4-24)  | 39 (9-66)  | < 0,0001 |
| ALAT normales          | 8 (80 %)   | 52 (81 %)  | NS       |
| PBH (n = 19)           | 2          | 17         | NS       |
| Métavir F1             | 0          | 4          | -        |
| Métavir F2             | 2          | 3          | -        |
| Métavir F3             | 0          | 1          | -        |
| Métavir F4             | 0          | 4          | -        |
| Ac. anti-VHC+          | 0          | 1          |          |
| Ac. anti-VHD totaux +  | 0          | 1          |          |
| Ac. anti-VHD IgM+      | 0          | 0          |          |

statistique. La présence de l'Ag HBe était associée à un âge plus jeune. On notera que la majorité des patients (80 %), quel que soit le statut HBe, ne présente pas d'élévation des transaminases et qu'aucun lien de corrélation n'a été retrouvé entre le taux de transaminases et le niveau de répllication virale. Les tests sérologiques indiquent une prévalence faible de la co-infection par le VHC ou le VHD dans la population étudiée. Aucun des patients étudiés n'était infecté par le VIH.

La PBH n'a été réalisée que chez 19 (25 %) patients et des lésions significatives, supérieures ou égales à A2 ou F2 selon le score métavir, ont été retrouvées chez dix patients, dont huit étaient Ag HBe négatif. Les quatre patients qui avaient une cirrhose avaient un statut Ag HBe négatif, des transaminases élevées et une répllication virale médiane à 7,2 Log UI/mL.

### 3.2. Caractérisation des génotypes du VHB

Le séquençage d'une portion du gène codant l'Ag HBs et la polymérase virale a permis de réaliser des analyses phylogéniques sur des séquences de plus de 600 nucléotides en intégrant des souches disponibles dans les bases publiques (Genbank). La Fig. 1 représente l'un des arbres phylogéniques obtenu selon la méthode de Neighbor Joining en appliquant le modèle Jukes-Cantor et un rééchantillonnage de 1000. Seuls quatre échantillons s'apparentent au génotype A, un échantillon au génotype E et la majorité (93 %) au génotype D. Le regroupement des souches algériennes et leur éloignement par rapport aux souches de génotype D de référence suggèrent un sous-type probablement différent de ceux décrits à ce jour. Une analyse du cadre de lecture de l'Ag HBs n'a pas révélé de mutation caractéristique, en particulier dans la région codant le déterminant « a » où aucune mutation d'échappement immunitaire n'était présente. Dans le cadre de lecture de la polymérase de génotype D, nous avons observé une prévalence plus importante de résidus particuliers : rtQ149K, rtR153W, rtP237T, par rapport aux souches de références de génotype D. Aucune mutation de résistance aux analogues nucléosidiques ou nucléotidiques n'a été identifiée.

### 3.3. Prévalence des mutations de la région précocore

Les patients infectés par un génotype A étaient tous Ag HBe négatif, alors que pour 13 % de ceux infectés par un génotype

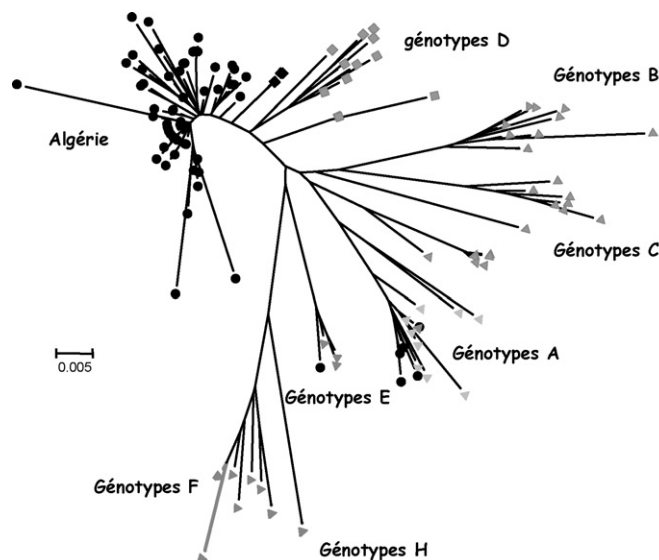


Fig. 1. Représentation d'un arbre phylogénique circulaire représentatif et obtenu par la méthode de Neighbor-Joining en appliquant le modèle de Jukes-Cantor et un rééchantillonnage de 1000. Les séquences algériennes (rond noirs) ont été comparées à 69 séquences de référence (triangles gris) de génotype A à H. L'échelle indique le nombre de substitutions par site.

D, il y avait persistance de l'Ag HBe. Les différentes mutations impliquées dans la modification de la production de l'Ag HBe ont été étudiées sur les séquences du gène précocore, Core et en amont de celui-ci (Tableau 2). Les résidus du promoteur A1762, G1764 et de la séquence signal précocore G1896 ont été principalement étudiés. Sur les quatre souches de génotype A, des mutations du promoteur ont été identifiées (T1762/G1764) alors qu'aucune mutation en précocore n'était sélectionnée. Chez les patients infectés par un génotype D, 75 % avaient une souche mutante en précocore et 51 % dans le promoteur du core. On note également pour le génotype D, 41 % des souches avec une double mutation sur le précocore et le promoteur. La prévalence des mutations du promoteur et du précocore était plus élevée en absence qu'en présence d'Ag HBe,  $p = 0,01$  et  $p < 0,0001$ , respectivement.

### 3.4. Répllication virale en fonction des différents marqueurs

La répllication virale moyenne était de 4,6 Log UI/mL et la majorité des patients (55 %) avaient une répllication inférieure à 4 Log UI/mL (Fig. 2). Une disparité significative a été observée en fonction du statut HBe. Chez les patients porteurs d'Ag HBe, 9/10 avaient une répllication virale supérieure à la limite

Tableau 2  
Répartition des mutations « précocore » en fonction du statut HBe et du génotype

|            | Mutations promoteur |           | Mutations précocore |           |
|------------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
|            | Ag HBe+             | Ag HBe-   | Ag HBe+             | Ag HBe-   |
| Génotype A | 0                   | 4 (100 %) | 0                   | 0         |
| Génotype D | 1 (11 %)            | 35 (57 %) | 1 (11 %)            | 51 (85 %) |
| Génotype E | 0                   | 0         | 0                   | 0         |
| Total      | 1 (10 %)            | 39 (60 %) | 1 (10 %)            | 51 (80 %) |

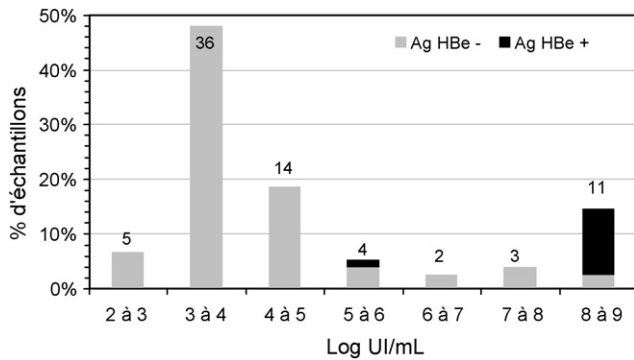


Fig. 2. Répartition des charges virales dans la population étudiée. Les pourcentages d'échantillons compris dans une fourchette de 1 Log UI/ml sont représentés en gris pour les profils Ag HBe négatif et en noir pour les Ag HBe positif. Le chiffre au-dessus des histogrammes indique le nombre absolu d'échantillons.

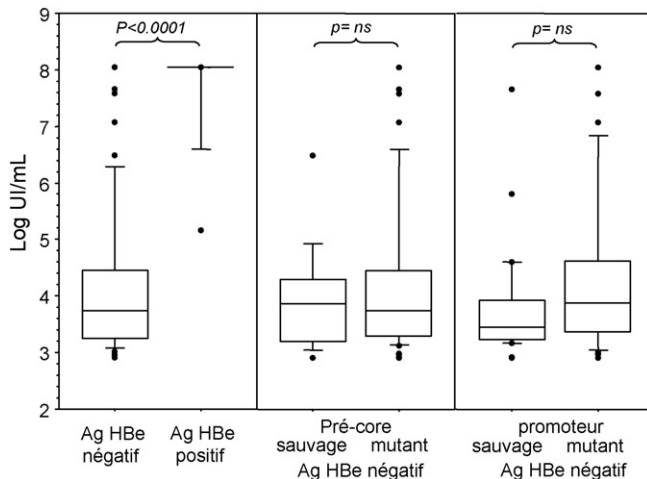


Fig. 3. Charge virale du VHB en fonction du statut HBe et de la présence de mutations précocore ou promoteur du core. Chaque panel représente des graphes en boîtes (75<sup>e</sup> percentiles) en fonction, de gauche à droite, de la présence ou non de l'Ag HBe, du phénotype sauvage ou mutant en précocore ou sur le promoteur.

supérieure de quantification de 110 millions d'UI/ml, alors que chez les Ag HBe négatifs ils n'étaient que 2/65 à franchir cette limite ( $p < 0,0001$ ). L'influence des mutations précocore et surtout du promoteur du core a été recherchée mais aucune différence significative n'a été retrouvée par rapport à la répllication virale (Fig. 3).

#### 4. Discussion

De très rares études ont été conduites en Algérie sur les patients porteurs chroniques du virus de l'hépatite B. Peu de données sont par ailleurs disponibles sur l'incidence de l'infection ou l'impact du portage chronique en termes de morbidité et de mortalité. L'étude que nous avons menée sur 75 patients du Nord-Est algérien indique qu'un pourcentage non négligeable de personnes infectées a déjà une pathologie avancée, voire une cirrhose et qu'une prise en charge thérapeutique devrait être envisagée pour ces patients. À

l'opposé, 21 % de la population étudiée avait une répllication virale inférieure à 2000 UI/mL et un taux de transaminases normales. La persistance de transaminases normales associée à une faible répllication virale seraient des arguments pour les classer comme porteurs inactifs dont l'évolution semble anodine à long terme comme le démontre Manno et al. [8]. Néanmoins, cette classification en porteur inactif reste sujette à discussion et doit être portée en fonction de chaque individu après un suivi rigoureux [4,9]. L'âge relativement jeune de certains patients indique par ailleurs qu'une transmission périnatale persiste avec un risque non négligeable d'évolution vers la chronicité. Ces données militent en faveur d'une stratégie vaccinale à large échelle auprès des enfants [10].

Nos résultats indiquent que l'hépatite chronique B sans Ag HBe est la forme nettement prédominante dans notre région. En effet, seulement 13 % des porteurs chroniques de l'Ag HBe ont un virus sauvage Ag HBe positif. Cette tendance épidémiologique est largement restituée dans les études récentes partout dans le monde, comme le rapporte l'étude de Funk et al. [11]. En France, l'étude de Zarski et al. démontre clairement que sur une dizaine d'années les porteurs chroniques Ag HBe négatif sont devenus largement prédominants avec une prévalence passant de 22 à 72 % [2]. De même, d'autres études de pays méditerranéens font état d'une prédominance de cette forme [12,13]. Dans notre étude, les patients Ag HBe positif sont plus jeunes ( $p < 0,001$ ) et présentent une répllication virale plus élevée que les patients anti-HBe positif. Ce résultat est tout à fait cohérent par rapport à l'histoire naturelle de la maladie après contamination dans l'enfance [3]. En effet, la maladie évolue habituellement de manière asymptomatique pendant plusieurs décades et la découverte de l'Ag HBe se fait souvent de manière fortuite à l'âge adulte alors qu'il y a eu séroconversion HBe. La caractérisation de patients sans Ag HBe mais avec une répllication virale élevée soulève un certain nombre de questions. Soixante-douze pour cent des patients Ag HBe négatif avaient une répllication virale supérieure à 2000 UI/mL et 25 % supérieure à 20 000 UI/mL, seuils classiquement admis comme péjoratifs pour l'évolution de la maladie hépatique [9]. Si l'on s'en tient par ailleurs aux travaux taiwanais sur l'influence du niveau de répllication virale sur le risque de développement de la cirrhose ou du carcinome hépatocellulaire, le pourcentage des patients suivis qui nécessiteraient un traitement ne serait donc pas négligeable [14]. Le nombre élevé de patients infectés par le génotype D récuse nécessairement l'usage de l'interféron et implique le recours à des inhibiteurs récents de la polymérase dont l'efficacité s'est largement améliorée [15,16]. La proportion importante de patients Ag HBe négatif est certainement à rapprocher du génotype D retrouvé dans notre population dont la caractéristique est d'évoluer rapidement vers des formes mutantes Ag HBe négatives. Comme l'a récemment démontré Livingston et al., le délai de séroconversion anti-HBe est lié au génotype et, pour le D, le délai médian était de moins de six ans [17].

La découverte du génotype D comme génotype prédominant (93 %) dans notre région n'est pas totalement surprenante. Des études internationales ont en effet démontré que le génotype D

avait une distribution mondiale mais était surtout prévalent dans la région méditerranéenne, le Proche et le Moyen-Orient et l'Asie du Sud [18,19]. Il a été également isolé en Afrique du Sud, Alaska, Australie et Papouasie et au Tibet [20]. Des études marocaines et tunisiennes ont aussi déjà rapporté la nette prédominance du génotype D en Afrique du Nord [21–23]. Cette répartition est donc cohérente avec une certaine homogénéité épidémiologique sur le pourtour méditerranéen. Il est intéressant de noter que l'équipe d'Ezzikouri a décrit, sur un nombre limité de souches, une particularité phylogénique des souches de génotype D isolées au Maroc. Dans notre étude, plusieurs méthodes d'analyses phylogéniques convergent et semblent clairement indiquer un regroupement très particulier des souches algériennes. Nous n'avons détecté aucune particularité sur le cadre de lecture de l'Ag HBs et aucun variant du déterminant « a » n'a été identifié. En revanche, une signature protéique sur le cadre de lecture de la polymérase est retrouvée plus fréquemment que dans les séquences de référence de génotype D, en particulier en position 237 (rtP237T), proche de résidus impliqués dans la résistance à l'adéfovir. Comme attendu, devant la faible diffusion des traitements anti-VHB en Algérie, aucune mutation de résistance connue aux antiviraux n'a été détectée. Nous menons actuellement des analyses complémentaires sur les génomes complets de virus algériens pour préciser l'éventuelle ségrégation de ces souches dans un sous-type particulier dans le génotype D. Ce dernier possède en effet une grande hétérogénéité et plusieurs sous-types différents circulent dans le monde [24]. On notera également la très large prédominance des porteurs Ag HBe négatif dans l'ensemble de ces pays d'Afrique du Nord. Le génotype A étant dominant ou codominant dans les pays d'Europe occidentale, on peut évoquer une autre source de contamination pour les quatre patients porteurs de ce génotype. Enfin, le seul génotype E retrouvé a été isolé chez une personne originaire du Mali et les études menées en Afrique subsaharienne rapportent généralement la prédominance de ce type de virus [6].

Sur les 19 patients qui ont eu une évaluation histologique hépatique, plus de la moitié avaient des lésions significatives dont quatre des cirrhoses. Bien qu'il ne soit pas possible de tirer des conclusions sur des effectifs aussi faibles, il faut souligner que la biopsie n'était proposée qu'aux patients ayant une cytolyse avérée. Il est maintenant admis qu'une absence de cytolyse ne signifie pas nécessairement une absence de lésion histologique et certaines recommandations proposent de réaliser une biopsie chez tout porteur chronique du VHB même avec des transaminases normales [25,26]. Nos résultats devront donc être confirmés sur un effectif plus large après biopsie systématique.

Le rôle des génotypes dans la progression de la maladie hépatique est controversé. Toutefois, la plupart des études récentes asiatiques, où les génotypes B et C sont prévalents, indiquent que les patients infectés par le VHB de génotype B progressent plus lentement vers la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire que les malades infectés par un virus de génotype C [27]. D'autres études ont comparé les génotypes A et D, certaines ont suggéré que le génotype D était associé à une évolution plus grave, alors que d'autres suggèrent que l'évolution vers l'hépatite chronique est plus lente pour le

génotype D [28]. L'équipe d'Halfon dans une étude transversale ne retrouve également pas de lien entre les génotypes et la progression de la maladie [29]. Du fait du nombre restreint de patients infectés par un génotype autre que le D, il n'est pas possible dans cette étude d'établir une association significative entre le génotype D et les différentes étapes de l'infection par le VHB comme il n'est pas possible non plus de lier le génotype au mode de contamination, même si la transmission transversale reste privilégiée.

Le phénotype HBe « sauvage » est clairement corrélé à l'absence de mutation sur le promoteur et le gène précore ( $p < 0,001$ ), alors que l'absence de production d'Ag HBe est associée dans 60 % des cas à un mutant du promoteur et dans 76 % des cas à un mutant précore. L'apparition des mutations semble liée à l'âge et par conséquent très certainement à la durée d'évolution de la maladie. Le génotype D est dans la majorité des cas associé à un mutant précore (75 %), alors que l'infection par le génotype A est associée dans tous les cas à un mutant du promoteur. Contrairement à ce qui a été rapporté in vitro, nous n'avons pas retrouvé de lien direct entre le niveau de répllication virale et la présence de mutations sur le promoteur du core [30,31]. Il faut cependant souligner que nous n'avons regardé spécifiquement qu'un nombre limité de positions et que d'autres nucléotides sont également impliqués dans la régulation de la répllication virale.

## 5. Conclusion

L'hépatite virale B constitue un problème de santé publique dans le monde et l'Algérie reste un pays d'endémie intermédiaire. La prévention, l'identification, le suivi ainsi que la prise en charge thérapeutique de l'hépatite B sont des mesures importantes pour la prévention de la cirrhose et du carcinome hépatocellulaire. La caractérisation du génotype D et des mutants Ag HBe négatif chez la majorité des personnes infectées par le VHB en Algérie est une étape indispensable pour adapter les stratégies de prévention et thérapeutique les plus rationnelles. La particularité phylogénique du génotype D circulant en Algérie devra être étudiée pour préciser l'histoire épidémiologique de cette infection.

## Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les patients ayant participé à cette étude, Véronique Boutonnet, Nathalie Hamm, Christelle Fovet, Dif Lamia, Mili Zahia et Cherouana Lamia pour leur expertise technique. Ces travaux ont été financés en partie par l'Agence française pour la recherche sur le sida et les hépatites virales (ANRS).

## Références

- [1] Gunther S. Genetic variation in HBV infection: genotypes and mutants. *J Clin Virol* 2006;36(Suppl. 1):S3–11.
- [2] Zarski JP, Marcellin P, Leroy V, Trepo C, Samuel D, Ganne-Carrie N, et al. Characteristics of patients with chronic hepatitis B in France: predominant frequency of HBe antigen negative cases. *J Hepatol* 2006;45(3):355–60.

- [3] Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* 2008;48(2):335–52.
- [4] Lai CL, Yuen MF. The natural history and treatment of chronic hepatitis B: a critical evaluation of standard treatment criteria and end points. *Ann Intern Med* 2007;147(1):58–61.
- [5] Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 2007;127(2):164–76.
- [6] Kramvis A, Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatol Res* 2007;37(s1):S9–19.
- [7] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24(8):1596–9.
- [8] Manno M, Camma C, Schepis F, Bassi F, Gelmini R, Giannini F, et al. Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: morbidity and mortality after 30 years. *Gastroenterology* 2004;127(3):756–63.
- [9] Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45(2):507–39.
- [10] Zuckerman J, van Hattum J, Cafferkey M, Gjørup I, Hoel T, Rummukainen ML, et al. Should hepatitis B vaccination be introduced into childhood immunisation programmes in northern Europe? *Lancet Infect Dis* 2007;7(6):410–9.
- [11] Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat* 2002;9(1):52–61.
- [12] Kondili LA, Brunetto MR, Maina AM, Argenti C, Chionne P, La Sorsa V, et al. Clinical and molecular characterization of chronic hepatitis B in Albania: a country that is still highly endemic for HBV infection. *J Med Virol* 2005;75(1):20–6.
- [13] Rodriguez-Frias F, Jardi R, Buti M, Schaper M, Hermosilla E, Valdes A, et al. Hepatitis B virus genotypes and G1896A precore mutation in 486 Spanish patients with acute and chronic HBV infection. *J Viral Hepat* 2006;13(5):343–50.
- [14] Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130(3):678–86.
- [15] Wiegand J, Hasenclever D, Tillmann HL. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther* 2008;13(2):211–20.
- [16] Zoulim F, Perrillo R. Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy. *J Hepatol* 2008;48(Suppl. 1):S2–19.
- [17] Livingston SE, Simonetti JP, Bulkow LR, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH, et al. Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology* 2007;133(5):1452–7.
- [18] Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003;46(6):329–38.
- [19] Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2008;80(1):27–46.
- [20] Cui C, Shi J, Hui L, Xi H, Zhuoma, Quni, et al. The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 11):2773–7.
- [21] Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Aouadi H, Sfar I, Najjar T, et al. Hepatitis B virus genotypes and precore/core-promoter mutations in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Infect* 2007;54(3):291–7.
- [22] Bahri O, Cheikh I, Hajji N, Djebbi A, Maamouri N, Sadraoui A, et al. Hepatitis B genotypes, precore and core promoter mutants circulating in Tunisia. *J Med Virol* 2006;78(3):353–7.
- [23] Ezzikouri S, Chemin I, Chafik A, Wakrim L, Nourlil J, Malki AE, et al. Genotype determination in Moroccan hepatitis B chronic carriers. *Infect Genet Evol* 2008;8(3):306–12.
- [24] De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D, Schiavini M, Milazzo L, et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology* 2007;365(1):113–24.
- [25] Lai M, Hyatt BJ, Nasser I, Curry M, Afdhal NH. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2007;47(6):760–7.
- [26] Kumar M, Sarin SK, Hissar S, Pande C, Sakhuja P, Sharma BC, et al. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus-infected asymptomatic patients with persistently normal ALT. *Gastroenterology* 2008;134(5):1376–84.
- [27] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118(3):554–9.
- [28] Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 2005;12(2):111–24.
- [29] Halfon P, Bourliere M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, et al. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat* 2006;13(5):329–35.
- [30] Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis P. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *J Gen Virol* 2008;89(Pt 4):901–9.
- [31] Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006;13(7):427–34.