

Étude de l'épidémiologie moléculaire et de la phylogénie des souches du virus de l'hépatite C sous-type 1b en Tunisie

Molecular and phylogenetic analyses of Tunisian hepatitis C virus strains subtype 1b

Selma Mejri^{1,2}
Salma Mhalla¹
Ahlem Ben Yahia¹
Henda Triki¹

¹ Laboratoire de virologie clinique, Institut Pasteur de Tunisie, Tunis Belvédère, Tunisie

² Laboratoire de virologie, Institut de la recherche vétérinaire de Tunisie, Tunis, Tunisie
<selma_mejri@yahoo.fr>

Résumé. Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus ubiquitaire, responsable d'infections chroniques pouvant aboutir à un hépatocarcinome. La prévalence d'infection par ce virus en Tunisie est de l'ordre de 0,7 %. Un taux relativement plus élevé a été confirmé dans la région du Nord-Ouest, notamment à Béjà. Les études de génotypage des souches virales tunisiennes montrent une large prédominance du sous-type 1b. Une étude antérieure a suggéré la circulation d'un « variant » spécifique du sous-type 1b, qui serait prédominant dans les régions urbaines du gouvernorat de Béjà. L'objectif du présent travail est de confirmer cette hypothèse, en analysant un nombre important de souches 1b, provenant d'autres régions de la Tunisie et de les comparer avec celles circulant au Nord-Ouest et avec d'autres provenant d'autres régions du monde. Nous avons effectué une analyse phylogénétique dans deux régions distinctes du génome viral : la NS5B et la E1. Les résultats montrent que plus de la moitié des souches tunisiennes étudiées se regroupent ensemble formant un cluster de séquences presque exclusivement tunisien. Ce cluster phylogénétique comprend la grande majorité des souches de Béjà. Ce résultat a été observé après les analyses en NS5B et en E1 du génome viral. Ces constatations confirment la circulation d'un variant particulier de souches VHC 1b en Tunisie, plus particulièrement au Nord-Ouest où il serait lié à une source commune de transmission du virus dans la région comme cela a été évoqué antérieurement.

Mots clés : virus de l'hépatite C, 1b, phylogénie, Tunisie

Abstract. Hepatitis C virus (HCV) is an important causative agent of chronic liver disease worldwide distributed. In Tunisia, reported HCV seroprevalence is about 0.7%, with higher infection rate in the North-East region (Béjà). Subtype 1b is the largely predominant genotype. As it was suggested in a previous study, a specific HCV variant, subtype 1b was circulating in Tunisia, especially in urban areas of the North-Nest region. The aim of this work was to assess phylogenetic relatedness between viruses circulating in different other parts of Tunisia, and to compare them with those from the North-West region, and with those from other countries. Phylogenetic analyses were carried out on two viral regions: the NS5B and the E1. Phylogenetic analyses identified a group of sequences forming a cluster including almost exclusively Tunisian strains. This phylogenetic cluster comprises more than the half of all investigated Tunisian strains, especially those from urban parts of Béjà (North-West). Such results were observed not only after investigations in the NS5B region, but also after analyses in the E1 viral region. All these observations confirm the hypothesis

Article reçu le 29 mars 2012,
accepté le 08 juin 2012

Tirés à part : S. Mejri

about the specific local variant of HCV subtype 1b in the country, particularly in the North-West. This local variant could be related to a common HCV transmission route, as it was suggested in a previous publication.

Key words: hepatitis C virus, subtype 1b, phylogeny, Tunisia

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) pose encore un problème majeur de santé publique. En effet, ce virus ubiquitaire est à l'origine de maladies chroniques graves du foie. Le VHC est un virus à ARN, faisant partie de la famille des *Flaviviridae* et dont le génome présente une importante hétérogénéité génétique. Les différents isolats du VHC sont répartis en 6 groupes génétiques différents désignés par des chiffres de 1 à 6 [1]. Certains groupes génétiques, ou génotypes, sont eux-mêmes subdivisés en sous-types [1]. Il a été clairement confirmé que les différents génotypes et sous-types du VHC ont une influence directe sur la sévérité de l'infection et sur la réponse au traitement antiviral [2, 3].

Les analyses phylogénétiques permettent, au-delà de la détermination du génotype et du sous-type viral, de mieux tracer les voies de transmission du VHC et d'étudier l'épidémiologie moléculaire des isolats du virus dans un pays ou dans une communauté donnée. Les différentes analyses moléculaires du VHC ont mis en évidence une variabilité importante de la répartition géographique des génotypes et sous-types du VHC. En effet, certains génotypes tels que les génotypes 1, 2 et 3 sont largement répandus dans le monde [4-6]. Par contre, d'autres génotypes ont une distribution beaucoup plus restreinte tels que le génotype 4 spécifique de l'Afrique centrale et du Moyen-Orient [7], le génotype 5 spécifique de l'Afrique du Sud et enfin le génotype 6 retrouvé surtout en Asie [8].

En Tunisie, la prévalence de l'infection par le VHC rapportée dans la population générale et chez les donneurs de sang varie de 0,4 % à 0,7 % [9, 10]. Cette prévalence est relativement plus importante dans la région du Nord-Ouest de la Tunisie, notamment dans le gouvernorat de Béja, où elle atteint 1,4 % [11]. Concernant le génotypage des souches du VHC circulant en Tunisie, le sous-type 1b est largement majoritaire dans tout le pays [11-13]. Suite à une étude des aspects épidémiologiques et moléculaires de l'infection par le VHC dans le Nord-Ouest de la Tunisie, la circulation d'un « variant » particulier du sous-type 1b spécifique à la Tunisie, et particulièrement à la région du Nord-Ouest, a été suggérée [11]. Ce variant circulerait surtout en milieu urbain de la région du Nord-Ouest. C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail, dont le principal objectif est de confirmer ou non cette hypothèse, et ce par l'analyse phylogénétique dans deux régions virales : la NS5B (codant pour la région non structurale 5B) et la E1 (codant pour

les glycoprotéines de l'enveloppe) d'un nombre assez important d'isolats 1b provenant de différentes régions de la Tunisie.

Matériel et méthodes

Ce travail a porté sur une population de 39 patients infectés par des souches VHC du sous-type 1b. Ces patients sont originaires de 3 régions géographiques différentes de la Tunisie et autres que la région du Nord-Ouest. Il s'agit, notamment, de Tunis (nord), de Nabeul (nord-est) et de Monastir (centre). Les 39 prélèvements ont été préalablement diagnostiqués anti-VHC positifs par sérologie Elisa et confirmés par la mise en évidence de l'ARN viral par PCR dans la région 5' non codante.

Pour les besoins de cette étude, une extraction de l'ARN viral présent dans tous les prélèvements étudiés a été effectuée. Cette extraction a été réalisée à partir de 140 µL de sérum et en utilisant le kit commercial QIAamp Viral RNA Mini Kit de Qiagen. Une synthèse de l'ADNc a été ensuite effectuée à partir de l'ARN extrait et ce en utilisant la M-MLV comme reverse transcriptase et le pd(N)₆ Random Hexamer comme amorce universelle. Une amplification dans la région NS5B du génome viral a été réalisée par la technique de PCR nichée sur les ADNc obtenus selon un protocole préalablement publié [14]. Le produit final de cette amplification est un fragment de 364 nucléotides. Les ADNc obtenus ont également fait l'objet d'une seconde amplification ciblant la région E1 du génome viral. Cette amplification a été effectuée par PCR nichée selon le protocole publié par Hotta en 1994 [15] et a permis l'obtention d'un fragment de 468 nt. Les produits d'amplification ont été purifiés en utilisant le QIAquick Gel Extraction kit commercialisé par Qiagen. Un séquençage de tous les produits d'amplification purifiés (en NS5B et en E1) a été réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique (Abiprism 3130 Genetic Analysis System – Applied Biosystems) et en utilisant le Kit (BigDye Terminator Sequencing Ready Reaction). À chaque isolat VHC correspondent deux séquences, l'une sens et l'autre non-sens. Cette double lecture permet de corriger d'éventuelles erreurs du séquençage et de déduire la séquence finale, ou consensus, pour chaque isolat. Les séquences consensus obtenues ont fait l'objet d'une étude phylogénétique. Pour chaque séquence, une

recherche des séquences les plus proches a été effectuée à l'aide du logiciel « Blast » dans la base internationale de séquences « GenBank ». L'analyse se poursuit par l'alignement de toutes les séquences consensus et celles qui leur sont proches en utilisant le logiciel d'alignement multiple ClustalX. L'analyse phylogénétique a été effectuée par les logiciels Mega et Phylip 3.5 (Phylogeny Inference Package) [16]. La construction des arbres phylogénétiques a été réalisée selon la méthode Neighbor-joining [17]. La visualisation des arbres phylogénétiques après ces différentes analyses a été possible grâce au programme TreeView [18]. Pour la construction des arbres phylogénétiques finaux, la séquence de référence HCV-1a (numéro d'accès dans GenBank : M62321) a été utilisée comme « Outgroup ».

Il est important de noter que pour les analyses phylogénétiques en NS5B, nous avons inclus dans l'étude phylogénétique d'autres séquences tunisiennes préalablement publiées : 25 séquences du Nord-Ouest [11], et 17 autres séquences tunisiennes sans précision de leurs origines géographiques [19, 20]. Pour l'étude de la phylogénie dans la région virale E1, nous avons inclus 25 séquences tunisiennes du Nord-Ouest, préalablement publiées [11], ceci dans le but d'étudier les caractéristiques génétiques d'un nombre plus important de séquences VHC 1b tunisiennes et de les comparer par rapport au probable variant circulant dans le Nord-Ouest du pays.

Résultats

Analyses dans la région NS5B du génome viral

L'analyse phylogénétique dans la région NS5B a concerné les 39 isolats investigués. Toutes les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences de référence représentatives des différents génotypes et sous-types du VHC. Les 39 séquences tunisiennes sont bien du sous-type 1b, puisqu'elles se sont toutes regroupées avec la séquence HCV-N représentative de ce sous-type.

La recherche dans GenBank de séquences similaires a permis la sélection de 67 séquences parmi celles les plus proches des séquences obtenues dans cette étude. Les numéros d'accès dans GenBank, le nom de l'isolat et le pays d'origine des 67 séquences sont indiqués dans le *tableau 1*. L'analyse phylogénétique en NS5B a compris également 42 autres séquences tunisiennes préalablement publiées dans GenBank, dont 25 sont du Nord-Ouest [11] et 17 avec origine géographique non précisée [19, 20]. Les numéros d'accès des séquences tunisiennes préalablement publiées sont fournis dans le *tableau 2*.

L'arbre phylogénétique final obtenu après les analyses en NS5B est représenté sur la *figure 1*. Toutes les séquences

tunisiennes sont indiquées par TUN. Les séquences obtenues dans cette étude sont en bleu. Les séquences tunisiennes de la région du Nord-Ouest [11] sont désignées successivement par le numéro d'accès dans GenBank, le nom de l'isolat et par NOu pour urbain (séquences en rouge) et NOR pour rural (séquences en marron). Les séquences tunisiennes sans précision de leur origine géographique sont en vert et désignées par leurs numéros d'accès dans GenBank suivis de TUN. Les séquences non tunisiennes sont désignées par le numéro d'accès dans GenBank suivi du pays d'origine.

Cette analyse phylogénétique montre que la plupart des séquences du Nord-Ouest se retrouvent regroupées ensemble, en particulier celles d'origine urbaine (12 sur les 16 incluses dans l'arbre), malgré l'injection d'un nombre assez important de nouvelles séquences tunisiennes. Par ailleurs, sur la totalité des 81 séquences tunisiennes incluses dans l'arbre phylogénétique, plus de la moitié (46 séquences) se regroupent ensemble dans un regroupement ou cluster comportant presque exclusivement des séquences tunisiennes (*figure 2*). Une seule séquence, issue d'une publication française, se retrouve dans ce regroupement. Ce cluster comprend la plupart des séquences du Nord-Ouest (21 sur 25), 18 parmi les 39 nouvelles séquences rapportées dans ce travail et 7 autres séquences tunisiennes. Pour les 35 séquences tunisiennes restantes, aucun autre regroupement significatif n'a pu être individualisé, les séquences sont éparpillées à travers l'arbre parmi les séquences d'autres pays.

Analyses dans la région E1 du génome viral

L'amplification par PCR dans la région E1 du génome viral suivi du séquençage a permis l'obtention de 6 séquences nucléotidiques parmi les 39 isolats VHC investigués. Les analyses phylogénétiques dans la région E1 ont permis l'obtention de l'arbre phylogénétique représenté sur la *figure 3*. Cet arbre comprend les 6 séquences obtenues dans ce travail (en bleu), 19 séquences de GenBank parmi celles les proches de nos 6 séquences et provenant d'autres pays (*tableau 3*), et 25 séquences tunisiennes préalablement publiées et provenant de la région du Nord-Ouest (*tableau 4*) dont celles du milieu urbain (en rouge) et celles du milieu rural (en marron). Il est important de noter que les seules séquences tunisiennes issues de la région E1 du VHC et accessibles dans GenBank sont celles de la région du Nord-Ouest. La séquence HCV-1-1a a été utilisée comme « Outgroup » lors de la construction de l'arbre phylogénétique de la *figure 3*.

L'arbre phylogénétique obtenu et représenté sur la *figure 3* confirme que, en région E1 également, la plupart des séquences tunisiennes se regroupent ensemble. Trois séquences du Nord-Ouest (mbv42/2-NOu, moa76/2-NOR

Tableau 1. Numéros d'accès dans GenBank, nom de l'isolat et pays d'origine des séquences non tunisiennes utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique en NS5B (figure 1).

N° accès	Nom de l'isolat	Pays	N° accès	Nom de l'isolat	Pays
EU155303	BID V346	USA	AB081055	Uz56	Ouzbékistan
AF165048	MD2-2	Japon	AJ000009	HCV-A	Australie
AB189092	clone: SA0	Japon	AF515992	P17.Rcp	France
AF165055	MD6-1	Japon	AB049101	HCVT221	Japon
AF165056	MD6-2	Japon	EU155219	BID V146	USA
AB189098	clone: KT-SVR	Japon	EU234061	BID V126	USA
DQ345627	MAD-R08975	Madagascar	AF207766	MD25	Japon
D14187	SRO33	Japon	EU234062	BID V135	USA
AY003963	BD268 clone II	Angleterre	AY957567	K1	Irlande
AY003962	BD268	Angleterre	AY957570	K4	Irlande
AY003969	BD268 clone VIII	Angleterre	Z97730	RBO1	Allemagne
AY587844	N589	Russie	AY682768	001501-1	USA
AB049098	HCVT209	Japon	EF608878	PatS13-w4	Espagne
D11168	JT	Japon	AB057692	Clone pt.33	Japon
AF506588	RIG134	Russie	AF313916	-	Irlande
S62220	HCV-N	Japon	AB154181	No. 6	Irlande
AF207774	MD33	Japon	AB154186	No. 11	Irlande
AJ291273	FrSSD88	France	AB154202	No. 27	Irlande
AB049088	HCVT094	Japon	AB154205	No. 30	Irlande
D85516	Serum 1B-1	Japon	AY944647	C09036	Italie
EF407467	2006	USA	EU155365	BID V289	Suisse
AF054247	pCV-J4L6S	USA	EF608910	PatM15-w4	Espagne
AF207758	MD17	Japon	AB081056	Uz56	Ouzbékistan
EF608849	PatS10-preTH	Espagne	EF407488	8016	USA
EU155222	BID V150	USA	EF407464	8050	USA
AF516037	MRS58	France	AY683122	02096-14	USA
AB081061	Uz96	Ouzbékistan	AF207760	MD19	Japon
AF282655	HO75	Angleterre	EU155301	BID V344	USA
EU155376	BID V311	Suisse	EU155232	BID V164	USA
EF608847	PatM6-w12	Espagne	AY683104	00535-12	USA
AY944674	N19155	Italie	AY683127	04220-03	USA
EF608860	PatM7-w48	Espagne	DQ417450	clone 12	Irlande
AB081038	Uz27h	Ouzbékistan	EF407496	4003	USA
AF506585	RIG128	Russie			

Copyright © 2017 John Libbey Eurotext. Downloaded by a robot coming from 54.191.40.80 on 20/06/2017.

et gv58/11-NOu) ainsi que trois de nos séquences (488-TUN2007, 433-TUN2004 et 165-TUN2004) se retrouvent un peu éloignées de ce regroupement ; ces séquences étaient également en dehors du cluster tunisien en NS5B. La séquence 49-TUN2006 était dans le cluster tunisien en NS5B et se retrouve assez éloignée de ces mêmes isolats en E1.

Discussion

Au-delà de la détermination du génotype et du sous-type des isolats du VHC, les analyses phylogénétiques permettent une meilleure caractérisation des souches virales. La région NS5B du VHC constitue une des régions de choix pour ce type d'étude [21]. D'autres régions du génome

viral, telles que la E1 et la E2 (codant toutes les deux pour les glycoprotéines de l'enveloppe) sont souvent utilisées en phylogénie pour confirmer des résultats obtenus après investigations d'autres régions virales, notamment le NS5B [22]. La région E1 est parmi les régions les plus variables du génome viral, ce qui rend l'amplification par PCR plus difficile. Ainsi, l'utilisation d'autres amorces pour l'amplification dans la région E1 est envisagée pour les sérums dont la PCR en E1 a été négative.

Les 39 séquences NS5B obtenues dans le cadre de cette étude et confirmées du sous-type 1b ont été comparées entre elles et à d'autres séquences tunisiennes et non tunisiennes. Parmi les séquences tunisiennes, nous avons inclus : 1) 25 séquences du gouvernorat de Béjà (nord-ouest) dont 16 isolées en milieu urbain et 9 en milieu rural, provenant de l'étude de Mejri *et al.* (2005) ; 2) 17 autres séquences

tunisiennes publiées dans GenBank par d'autres auteurs et dont l'origine géographique n'a pas été précisée. Le principal objectif de cette étude était d'analyser un nombre plus important de séquences tunisiennes, de voir si des variants spécifiques de région ou du pays s'individualisent et se confirment. En effet, l'étude de Mejri qui a porté sur 40 souches de VHC isolées au Nord-Ouest (au gouvernorat de Béjà), lesquelles ont été comparées à d'autres séquences tunisiennes et non tunisiennes, avait trouvé un regroupement contenant la majorité des séquences tunisiennes et exclusivement des séquences tunisiennes. L'étude avait suggéré l'existence d'un variant du sous-type 1b particulier à la Tunisie. Toutefois, étant donné que la majorité des souches tunisiennes étudiées provenaient de Béjà (40 contre 13 autres souches tunisiennes uniquement), il n'était pas possible de savoir si ce probable « variant » était spécifique à la Tunisie ou à la région de Béjà uniquement. Il fallait confirmer l'existence ou non de ce variant par l'inclusion d'un nombre plus important de séquences tunisiennes isolées dans d'autres régions du pays. C'est ainsi que notre travail rajoute à ces séquences préalablement étudiées 39 nouvelles séquences tunisiennes isolées dans 3 autres gouvernorats. L'analyse du nouvel arbre phylogénétique obtenu (*figure 1*) montre que, malgré l'injection d'un nombre assez important de nouvelles séquences (séquences en bleu) et sur la totalité des 81 séquences tunisiennes étudiées, plus de la moitié (n = 46) se regroupent ensemble dans un regroupement ne contenant que des séquences tunisiennes et une seule

séquence (AF516037), issue d'une publication française [23]. Ceci est très en faveur de l'existence réelle d'un variant spécifique de la Tunisie. Concernant la séquence française AF516037 qui s'est regroupée dans ce cluster tunisien, elle a été rapportée dans une étude portant sur des souches de VHC isolées chez des donneurs de sang et des transfusés dans la région de Marseille (France) sans précision sur la nationalité et l'origine géographique des individus étudiés. Étant donné le nombre important de sujets originaire d'Afrique du Nord vivant à Marseille et fréquentant les structures sanitaires de la région, il est probable que cette souche ait été isolée chez un patient d'origine tunisienne ou même qu'elle ait été transmise à un français par un patient d'origine tunisienne. L'existence de variants locaux a déjà été démontrée dans d'autres pays par l'analyse de séquences amplifiées dans les régions NS5 et NS3 [24] ou par l'analyse des séquences du core, E1 et NS5B [25]. Sur les 39 nouvelles séquences rapportées dans le présent travail, 18 se trouvent dans ce cluster tunisien (8 de Tunis, 6 de Monastir et 4 de Nabeul) sans regroupement significatif particulier de séquences provenant d'un même gouvernorat contrairement aux séquences provenant de Béjà, en particulier celles d'origine urbaine (en rouge), qui restent toujours très proches. Ceci renforce l'hypothèse d'une transmission locale du VHC, probablement d'origine nosocomiale à Béjà, tel que suggéré par l'étude cas-témoin publiée par Ben Alaya-Bouafif en 2007 [26].

Tableau 2. Numéros d'accès à GenBank, le nom de l'isolat, l'auteur et l'année de publication des séquences tunisiennes utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique en NS5B (*figure 1*).

N° accès	Nom de l'isolat	Auteur – année de publication	N° accès	Nom de l'isolat	Auteur – année de publication
AF462283	TN2	Djebbi – 2004	AY387601	beh48/1	Mejri – 2005
AF462284	TN11	Djebbi – 2004	AY387630	mbv283/1	Mejri – 2005
AF462286	TN15	Djebbi – 2004	AY387625	mbv211/1	Mejri – 2005
AF462287	TN18	Djebbi – 2004	AY387607	kdh65/2	Mejri – 2005
AF462288	TN21	Djebbi – 2004	AY387628	mbv227/1	Mejri – 2005
AF462290	TN24	Djebbi – 2004	AY387634	gv155/1	Mejri – 2005
AF462292	TN31	Djebbi – 2004	AY387600	beh23/1	Mejri – 2005
AF462293	TN33	Djebbi – 2004	AY387633	gv66/1	Mejri – 2005
AF462294	TN38	Djebbi – 2004	AY387627	mbv221/2	Mejri – 2005
AF462295	TN42	Djebbi – 2004	AY387621	mbv105/1	Mejri – 2005
AF462296	TN43	Djebbi – 2004	AY387622	mbv121/1	Mejri – 2005
DQ508466	K16	Hmaied – 2006	AY387610	kdh156/2	Mejri – 2005
DQ508470	K25	Hmaied – 2006	AY387629	mbv277/1	Mejri – 2005
DQ508475	K30	Hmaied – 2006	AY387618	mbo487/1	Mejri – 2005
DQ508461	A22	Hmaied – 2006	AY387624	mbv209/5	Mejri – 2005
DQ508469	K22	Hmaied – 2006	AY387631	mbv292/1	Mejri – 2005
DQ508477	I12	Hmaied – 2006	AY387637	moa67/2	Mejri – 2005
AY387632	gv58/11	Mejri – 2005	AY387612	kdh173/1	Mejri – 2005
AY387638	moa76/2	Mejri – 2005	AY387602	beh71/1	Mejri – 2005
AY387620	mbv42/2	Mejri – 2005	AY387614	mbo270/3	Mejri – 2005
AY387604	beh182/1	Mejri – 2005	AY387619	mbv42/1	Mejri – 2005

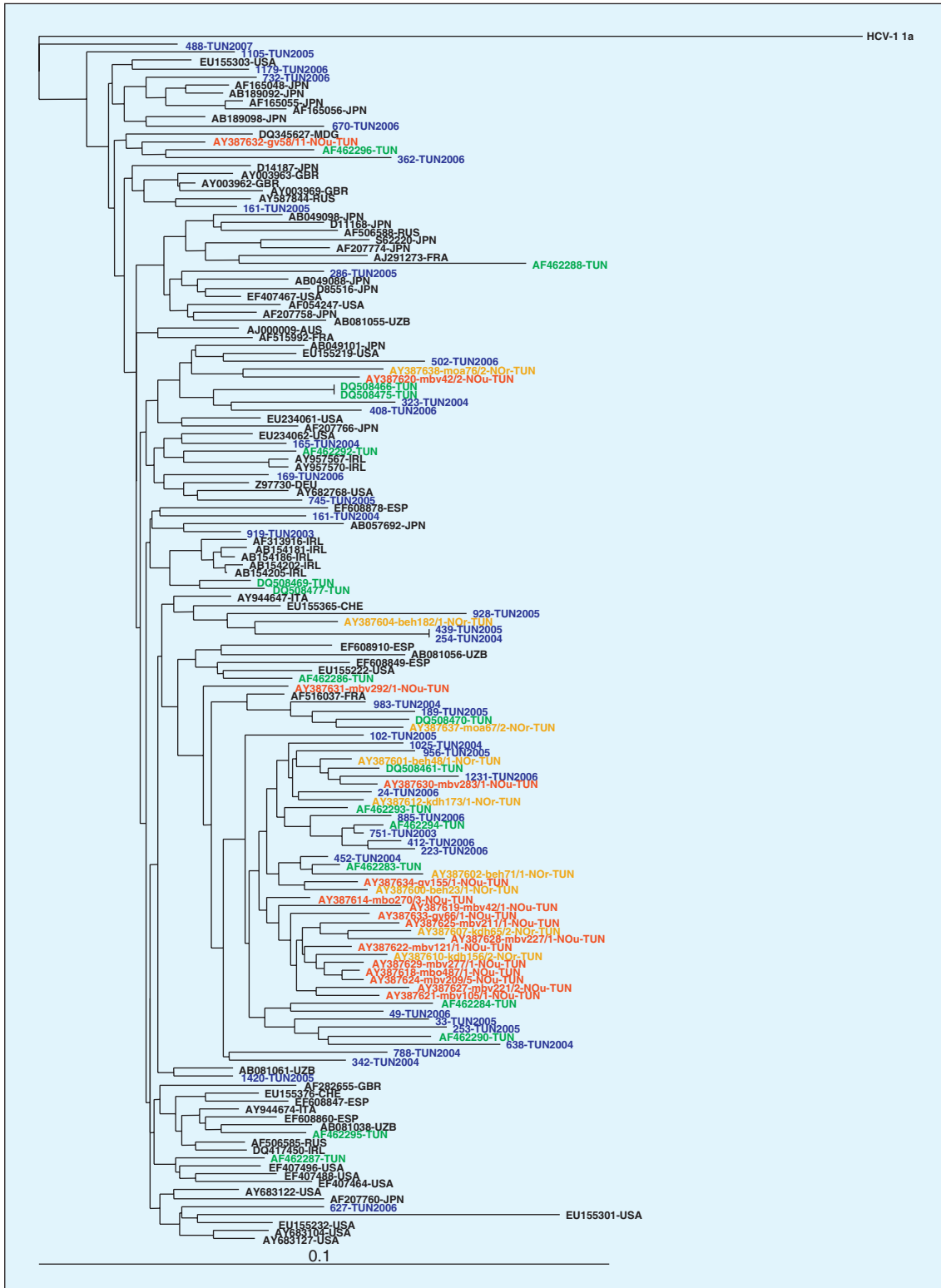


Figure 1. Arbre phylogénétique en NS5B. Les 39 séquences obtenues dans cette étude sont en bleu et désignées par le numéro de l'isolat suivi de TUN et de l'année d'isolement. Les séquences tunisiennes de la région du Nord-Ouest sont désignées successivement par le numéro d'accès dans GenBank, le nom de l'isolat et par NOu pour urbain (séquences en rouge) et NOr pour rural (séquences en marron). Les séquences tunisiennes sans précision de leur origine géographique sont en vert et désignées par leurs numéros d'accès dans GenBank suivis de TUN. Les séquences non tunisiennes sont désignées par le numéro d'accès dans GenBank suivi du pays.

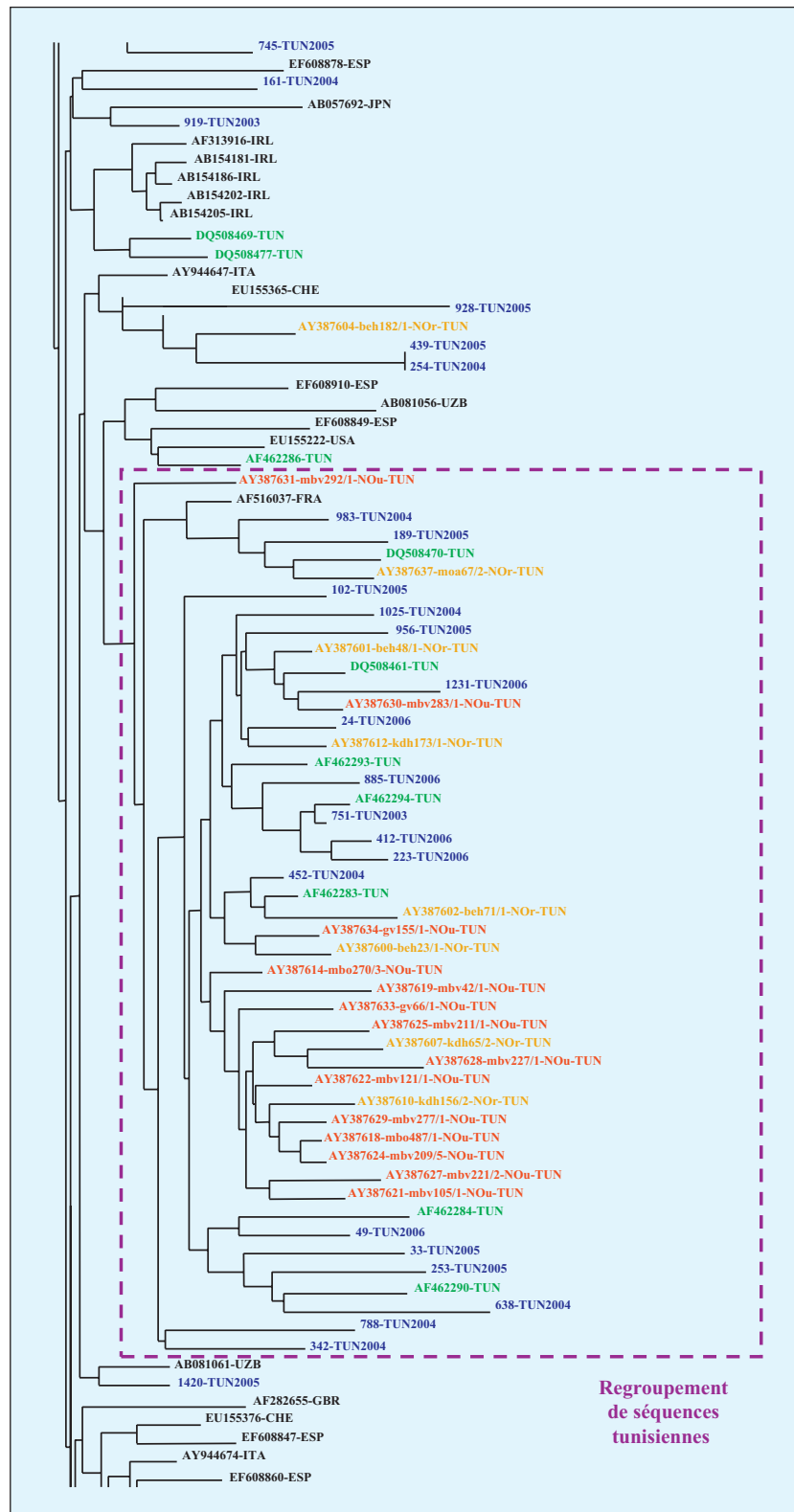


Figure 2. Agrandissement de la figure centré sur le regroupement spécifique des séquences tunisiennes et qui comprend 46 parmi les 81 séquences tunisiennes incluses dans l'arbre phylogénétique en NS5B.

En dehors de ce « variant » tunisien, 21 sur les 39 séquences obtenues dans le présent travail ainsi que 14 autres séquences tunisiennes préalablement publiées dans GenBank, se retrouvent en dehors du regroupement de séquences tunisiennes dans l'arbre phylogénétique de la *figure 1*. Ces séquences sont dispersées à travers l'arbre phylogénétique, au milieu de séquences provenant d'autres pays du monde sans que des regroupements additionnels n'aient pu être retrouvés. A notre connaissance, une seule étude tunisienne avait auparavant comparé des séquences VHC tunisiennes aux autres séquences publiées dans la base de séquences internationale : il s'agit de l'étude de

Djebbi en 2004 [20] et qui a porté sur 32 souches de VHC dont 14 uniquement appartiennent au sous-type 1b. Cette étude avait montré que les séquences les plus proches des séquences tunisiennes du sous-type 1b provenaient de pays européens (France et Angleterre). Notre travail permet l'étude d'un nombre plus important de souches tunisiennes du sous-type 1b (35 séquences) et de les comparer par rapport à un nombre également plus important de souches non tunisiennes actuellement disponibles dans GenBank. Cette comparaison a été faite en plusieurs étapes. D'abord, les séquences tunisiennes ont été soumises à la base de séquences internationale par le programme Blast et, sur plus de 7 900 séquences dans la région NS5B actuellement disponibles, les 67 séquences incluses dans l'arbre phylogénétique de la *figure 1* sont celles qui se rapprochent le plus des séquences tunisiennes. L'analyse de l'arbre phylogénétique a permis ensuite de retrouver, pour chaque séquence tunisienne, la séquence qui lui est la plus proche parmi les 67 séquences présélectionnées. Nous avons trouvé que, dans la grande majorité des cas, les séquences les plus proches de nos séquences sont d'origine européenne ou américaine (*tableau 1*). Les séquences américaines ont été publiées après le travail de Djebbi *et al.* 2004 [20], une en fin 2004 et les autres en 2008. D'une manière plus générale, ces résultats illustrent l'ouverture de la Tunisie vers les pays européens et l'occident, en particulier en termes de mouvement de populations (émigration dans un sens et tourisme dans l'autre sens) et de relations socio-économiques. Toutefois, il faut aussi noter que, dans les souches actuellement publiées dans la base de séquence internationale, il y a une large prédominance de séquences provenant de l'occident et un nombre nettement plus faible de séquences, particulièrement du sous-type 1b, provenant d'autres pays africains ou arabes.

Comme en NS5B, nous avons aussi comparé nos séquences en E1 avec d'autres séquences tunisiennes et non tunisiennes publiées. Nous devons toutefois noter le faible nombre de séquences tunisiennes disponibles dans cette région ; seules les séquences soumises par Mejrî et provenant toutes du gouvernorat de Béjà ont été retrouvées. Comme pour la région NS5B, l'arbre phylogénétique obtenu montre que la grande majorité des séquences tunisiennes (24 sur 31) se sont regroupées ensemble ; toutes faisaient partie du cluster tunisien retrouvé en NS5B. De même, 5 séquences (mbv42/2-NOu, moa76/2-NOr, gv58/11-NOu, 488-TUN2007 et 165-TUN2004) qui se retrouvent éloignées de ce regroupement de séquences tunisiennes en E1 étaient également en dehors du cluster tunisien en NS5B. Ces résultats préliminaires confirment donc ceux obtenus dans la NS5B, mais il est indispensable de rajouter plus de séquences en E1 de souches tunisiennes provenant de régions autres que le Nord-Ouest.

Copyright © 2017 John Libbey Eurotext. Downloaded by a robot coming from 54.191.40.80 on 20/06/2017.

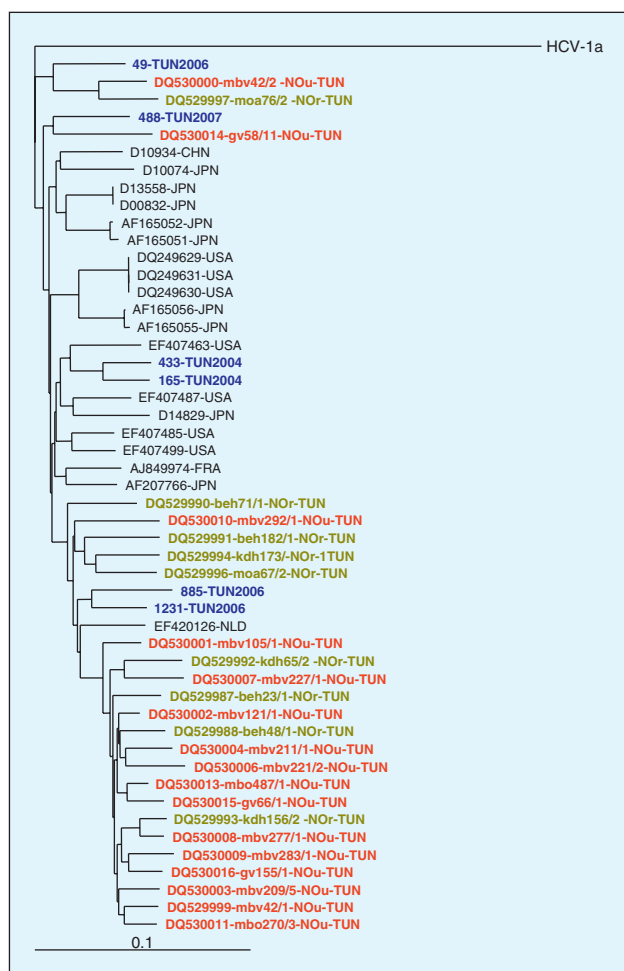


Figure 3. Arbre phylogénétique représentant les résultats des analyses dans la région E1 du génome viral. Il comprend les 6 nouvelles séquences tunisiennes issues du présent travail en bleu et désignées par le numéro de l'isolat suivi du pays et de l'année d'isolement, et les 25 séquences du Nord-Ouest tunisien publiées dans GenBank par Mejrî en 2006, isolées en milieu urbain (en rouge) ou rural (en marron) et désignées successivement par le N° d'accès à GenBank, le nom de l'isolat, NOu ou NOr (pour Nord-Ouest, urbain ou rural) et le pays.

Tableau 3. Numéros d'accès à GenBank, nom de l'isolat et pays d'origine des séquences non tunisiennes utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique en E1 (figure 3).

N° d'accès	Nom de l'isolat	Pays
D10934	HC-C2	Chine
D10074	HC-J2	Japon
D13558	HC-J4/83	Japon
D00832	HC-J4	Japon
AF165052	MD4-2	Japon
AF165051	MD4-1	Japon
AF165056	MD6-2	Japon
AF165055	MD6-1	Japon
D14829	Clone pMHCON76	Japon
AF207766	MD25	Japon
DQ249629	Clone DO56-E1-25	USA
DQ249631	Clone DO56-E1-27	USA
DQ249630	Clone DO56-E1-26	USA
EF407487	6057	USA
EF407463	5049	USA
EF407485	7026	USA
EF407499	7005	USA
AJ849974	Pt-12	France
EF420126	P21	Pays-Bas

Tableau 4. Numéros d'accès à GenBank et le nom de l'isolat des séquences du Nord-Ouest tunisiennes publiées par Mejri et utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique en E1 (figure 3).

N° d'accès	Nom de l'isolat
DQ529997	moa76/2
DQ529991	beh182/1
DQ529994	kdh173/1
DQ529996	moa67/2
DQ530001	mbv105/1
DQ530013	mbo487/1
DQ530015	gv66/1
DQ529993	kdh156/2
DQ530008	mbv277/1
DQ529999	mbv42/1
DQ530011	mbo270/3
DQ530014	gv58/11
DQ530003	mbv209/5
DQ530009	mbv283/1
DQ530016	gv155/1
DQ529987	beh23/1
DQ529988	beh48/1
DQ530002	mbv121/1
DQ530004	mbv211/1
DQ530006	mbv221/2
DQ529992	kdh65/2
DQ530007	mbv227/1
DQ530000	mbv42/2
DQ529990	beh71/1
DQ530010	mbv292/1

Conclusion

Ce travail contribue à une meilleure connaissance de la variabilité génétique des souches du VHC circulant en Tunisie, au sein du sous-type 1b prédominant. Les analyses phylogénétiques en NS5B montrent une diversité génétique importante au sein de ce sous-type 1b avec la circulation d'un variant tunisien qui compterait pour environ la moitié des souches circulantes. Le reste des isolats identifiés forme un groupe très hétérogène pouvant résulter d'introductions multiples du virus dans le pays et n'ont probablement pas établi de chaîne de transmission aussi large que le variant local tunisien.

Conflits d'intérêts : aucun.

Ce travail a été financé par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique tunisien (projet : LR11IPT09).

Références

- Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, *et al.* Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses : proposals for standardization. *Arch Virol* 1998 ; 143 : 2493-502.
- Remy AJ, Verdier E, Perney P, Ducos J, Blanc P, Blanc F, *et al.* Route of infection, liver histology and response to interferon in patients with chronic hepatitis caused by genotype 4 HCV infection in a Western country. *J Hepatol* 1998 ; 29 : 169.
- Chemello L, Alberti A, Rose K, Simmonds P. Hepatitis C serotype and response to interferon therapy. *N Engl J Med* 1994 ; 330 : 143.
- Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus : quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995 ; 15 : 41-63.
- Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, *et al.* Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J infect Dis* 1995 ; 171 : 1607-10.
- Nousbaum JB. Les sous-types génomiques du virus de l'hépatite C : épidémiologie, diagnostic et conséquences cliniques. *Bull Soc Path Ex* 1998 ; 91 : 29-33.
- Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Sherlock S, *et al.* Hepatitis C virus genotypes : an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994 ; 19 : 13-8.
- Simmonds P, Mellor J, Sakuldarnongpanich T, Nuchaprayoon C, Tanprasert S, Holmes EC, *et al.* Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia : comparison with classifications based upon sequence similarity. *J Gen Virol* 1996 ; 77 : 3013-24.
- Triki H, Said N, Ben Salah A, Arrouji A, Ben Ahmed F, Bouguerra A, *et al.* Seroepidemiology of hepatitis B, C and delta viruses in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 1997 ; 91 : 11-4.
- Gorgi Y, Yalaoui S, Ben Nejma H S, Azzouz MM, Hsairi M, Ben Khe-lifa H, *et al.* Dépistage de l'hépatite virale C dans la population générale en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot* 1998 ; 91 : 177.
- Mejri S, Ben Salah A, Triki H, Ben Alaya N, Djebbi A, Dellagi K. Contrasting patterns of hepatitis C virus infection in two regions from Tunisia. *J Med Virol* 2005 ; 76 : 185-93.

12. Ben Moussa M, Barguellil F, Bouziani A, Amor A. Comparison of two hepatitis C virus typing assays in a Tunisian population. *Ann Biol Clin* 2003 ; 61 : 234-8.
13. Djebbi A, Triki H, Bahri O, Cheikh I, Sadraoui A, Ben Ammar A, *et al.* Genotypes of hepatitis C virus circulating in Tunisia. *Epidemiol Infect* 2003 ; 130 : 501-5.
14. Desenclos JC, Bourdiol-Razès M, Rolin B, Garandeau P, Ducos J, Bréchet C, *et al.* Hepatitis C in a ward for cystic fibrosis and diabetic patients : possible transmission by spring-loaded finger-stick devices for self-monitoring of capillary blood glucose. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001 ; 22 : 701-7.
15. Hotta H, Doi H, Hayashi T, Puranta M, Soemarto W, Mizokami M, *et al.* Analysis of the core and E1 envelope region sequences of a novel variant of hepatitis C virus obtained in Indonesia. *Arch Virol* 1994 ; 136 : 53-62.
16. Felsenstein J. 1993 PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington : <http://WWW.caos.kun.nl/cammsa/PHYLIP>.
17. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method : a new method for 7 reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo* 1987 ; 4 : 406-25.
18. Page RDM. Treeview : an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput App Biosci* 1996 ; 12 : 357-8.
19. Hmaied F, Ben Mamou M, Saune-Sandres K, Rostaing L, Slim A, Arrouji Z, *et al.* Hepatitis C virus infection among dialysis patients in Tunisia : incidence and molecular evidence for nosocomial transmission. *J Med Virol* 2006 ; 78 : 185-91.
20. Djebbi A, Mejri S, Thiers V, Triki H. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from Tunisian patients. *Eur J Epidemiol* 2004 ; 19 : 555-62.
21. Maertens G, Stuyver L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In : Harrison TJ, Zuckerman AJ, eds. *The molecular medicine of viral hepatitis*. Chichester (England) : John Wiley & sons Ltd, 1997 : 183-233.
22. Duffy M, Salemi M, Sheehy N, Vandamme AM, Hegarty J, Curry M, *et al.* Comparative rates of nucleotide sequence variation in the hyper-variable region of E1/E2 and the NS5b region of hepatitis C virus in patients with a spectrum of liver disease resulting from a common source of infection. *Virology* 2002 ; 301 : 354-64.
23. Cantaloube JF, Biagini P, Attoui H, Gallian P, de Micco P, de Lamballerie X. Evolution of hepatitis C virus in blood donors and their respective recipients. *J Gen Virol* 2003 ; 84 : 441-6.
24. Pernas M, Bartolom J, Castillo I, Quiroga JA, Pardo M, Carrefio V. Sequence of non-structural regions 3 and 5 of hepatitis C virus genomes from Spanish patients : existence of a predominant variant related to type 1b. *J Gen Virol* 1995 ; 76 : 415-20.
25. Lu L, Nakano T, Smallwood GA, Heffron TG, Robertson BH, Hagedorn CH. A refined long RT-PCR technique to amplify complete viral RNA genome sequences from clinical samples : application to a novel hepatitis C virus variant of genotype 6. *J Virol Methods* 2005 ; 126 : 139-48.
26. Ben Alaya-Bouafif N, Triki H, Méjri S, Bahri O, Chlif S, Bettaieb J, *et al.* A case control study to assess risk factors for hepatitis C among a general population in a highly endemic area of northwest Tunisia. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2007 ; 84 : 1-4.