

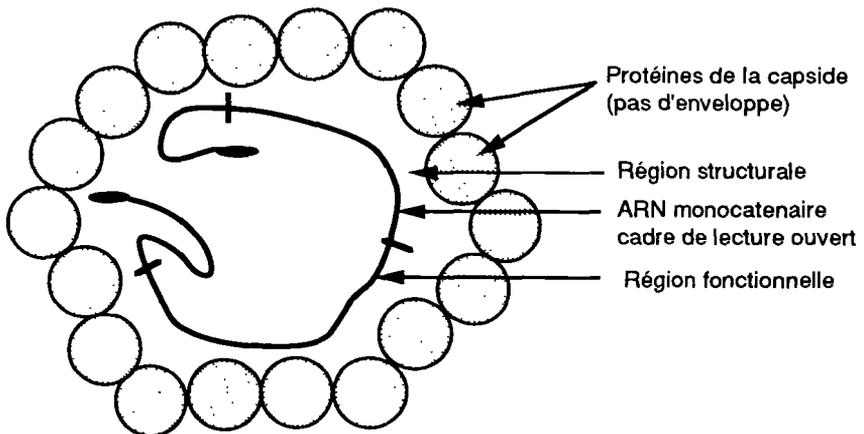
Les virus des hépatites

Les connaissances ont beaucoup évolué au cours des cinq dernières années et ont permis en particulier le démembrement des hépatites autrefois appelées Non-A, Non-B. On distingue actuellement les hépatites de A à E.

Virus de l'hépatite A

Il a été identifié en 1973. Le virus de l'hépatite A (VHA) fait partie de la famille des Picornavirus (qui inclut également le Poliovirus). Le génome ARN du virus code pour une polyprotéine qui est clivée secondairement en différentes protéines (Figure 1). Il existe différents isolats de VHA mais le degré de variation en nucléotides et en acides aminés est faible parmi ces différents isolats (1 à 10%).

Figure 1 : Structure interne du virus de l'hépatite A



Parmi les différences entre le VHA et les Picornavirus, la stabilité du VHA à la chaleur est supérieure ; cette observation suggère des différences de structure entre le virus de l'hépatite A et les autres entérovirus.

Le virus de l'hépatite A a été isolé sur culture cellulaire. Cependant la réplication virale est très limitée. Dans ces expériences le virus est capable d'établir une infection persistante mais il n'y a pas d'abolition de synthèse des protéines cellulaires et l'effet cytopathogène *in vitro* est très peu marqué, contrairement au Picornavirus. *In vivo* les mécanismes de cytotoxicité du VHA restent mal connus mais ne semblent pas directement liés à la réplication du virus ; elle ferait intervenir des réactions immunitaires en particulier à médiation cellulaire.

Tropisme et multiplication

Le virus de l'hépatite A a un tropisme uniquement hépatocytaire et des sites de réplication extra hépatique n'ont pas été identifiés. La pénétration se fait à travers la barrière gastro-intestinale. Après pénétration dans l'hépatocyte la multiplication du génome est assurée par la synthèse d'un ARN à polarité négative ; cet ARN sert d'intermédiaire pour la synthèse de l'ARN génomique à polarité positive. Cet ARN génomique est encapsidé mais parallèlement un grand nombre de particules virales sont synthétisées. Les virions sont sécrétés dans les canaux biliaires puis excrétés dans les selles.

Evolution de l'infection virale

Fait essentiel : il n'y a pas de portage chronique du virus de l'hépatite A. L'infection aiguë peut être symptomatique chez environ 10% des patients ; on a décrit des cas exceptionnels d'évolution vers une hépatite fulminante mais il n'y a jamais de passage à la chronicité. Il faut cependant noter que des rechutes d'hépatites aiguës A ont été bien documentées ; dans ces cas la recherche du VHA dans les selles de ces patients est positive suggérant que ces rechutes sont liées à la persistance de l'infection VHA.

Modes de contamination

La contamination se fait essentiellement par voie oro-fécale. Les infections par le VHA ont une prévalence maximale dans des régions avec un niveau d'hygiène mauvais. Cette observation explique que la fréquence

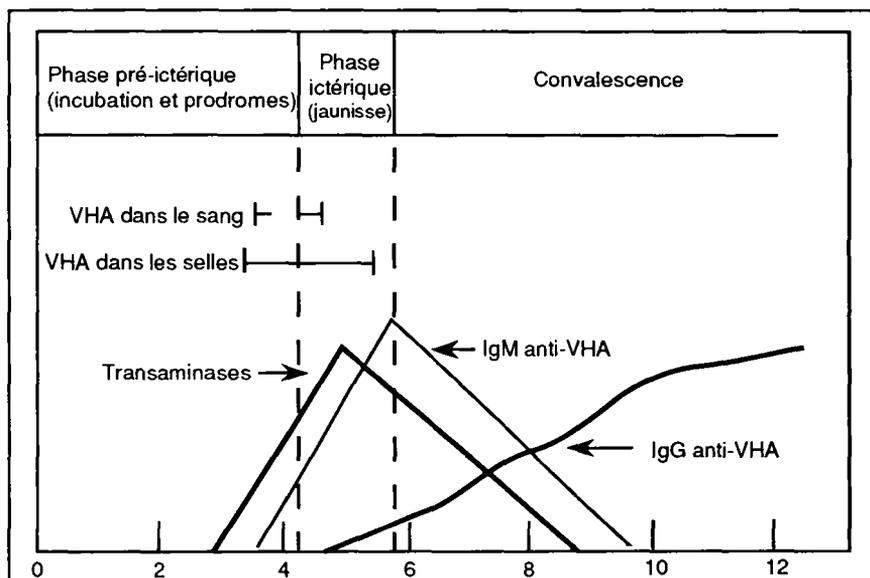
des infections VHA dans des pays "développés" diminue ; dans ces conditions le pourcentage d'individus adultes susceptibles d'être contaminés à l'occasion de voyage par le VHA a augmenté de façon très significative au cours des dernières années. Des données récentes suggèrent cependant que, dans certains cas très particuliers, il puisse y avoir une transmission par voie transfusionnelle : (des cas ont en effet été rapportés chez des hémophiles) ou sexuelles.

Evolution sérologique

La virémie VHA est brève et n'est généralement pas identifiable en pratique clinique. La période d'incubation est d'environ 28 jours et l'excrétion fécale du virus est généralement maximale juste avant les symptômes. Le diagnostic repose sur la présence des anticorps anti VHA de classe IgM, présente dès le début des symptômes cliniques. Cette réponse IgM est de durée courte, comparée à la réponse IgG qui persistera de façon très prolongée.

Un exemple représentatif de l'évolution sérologique est montré sur la figure 2.

Figure 2 : Cinétique des anticorps anti-VHA au cours de l'infection aiguë par le virus de l'hépatite A



Virus de l'hépatite B

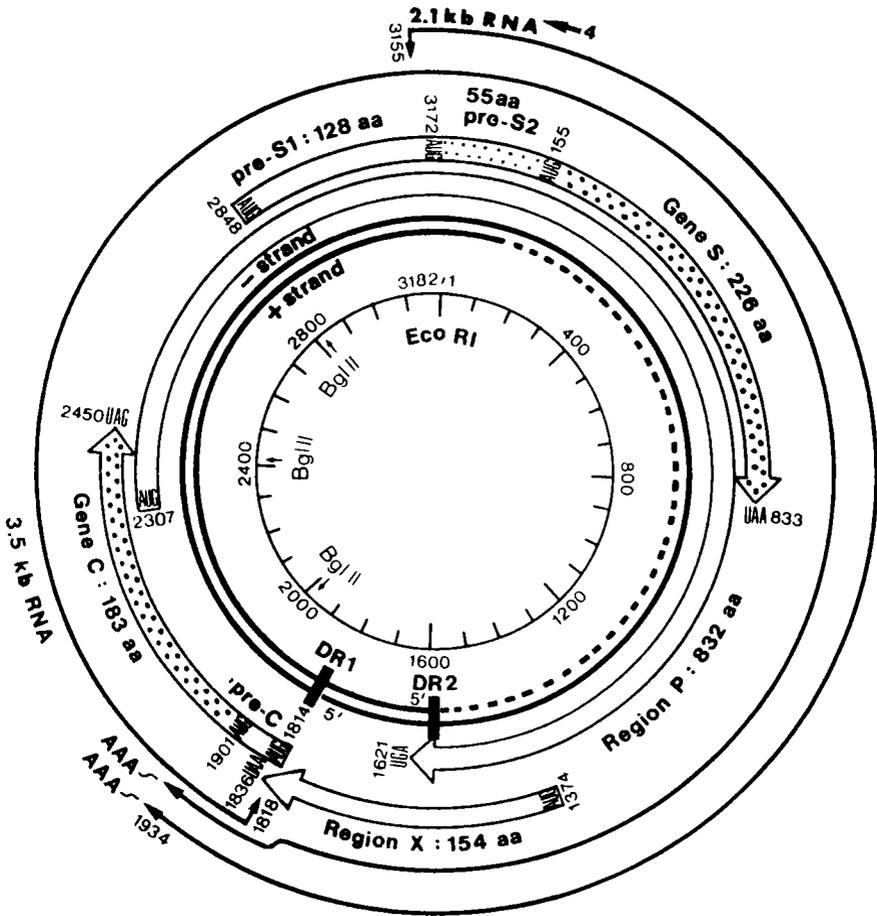
Les particules virales

Les particules virales identifiées dans le sérum d'un sujet infecté sont schématiquement de deux types : particules infectieuses sphériques de 42 nanomètres (particules de Dane) qui constituent le virion complet (10^9 ou plus particules/ml) (Figure 3) et des enveloppes vides de 22 nanomètres non infectieuses (utilisées pour la préparation des vaccins) et largement en excès par rapport aux particules de Dane (10^{13} ou plus particules/ml). La particule de Dane comprend une enveloppe lipoprotéique portant les déterminants de l'antigène de surface : Ag HBs qui entoure une nucléocapside (core de 27 nanomètres). Deux antigènes sont trouvés dans la nucléocapside : l'antigène HBc et l'antigène HBe. Ces deux déterminants sont codés par la même région du génome viral (PreC/C) mais seul l'antigène HBe est sécrété sous forme soluble dans le plasma. Dans la capsid se trouve l'ADN du virus de l'hépatite B. On peut également détecter par un test *in vitro* une activité ADN polymérase. Enfin une activité kinase a été également décrite associée au virion dont la signification n'est pas bien connue : elle pourrait phosphoryler le polypeptide principal de la capsid.

Les mécanismes de la nécrose hépatocytaire liée à une infection par le virus de l'hépatite B

Il est généralement admis que le virus de l'hépatite B n'a pas d'effet cytotoxique. Ce dogme est basé essentiellement sur l'absence de corrélation directe entre l'intensité de multiplication du virus et le degré de cytolysse. Par exemple, chez des sujets immunosupprimés, on peut observer des taux forts de virémie qui coexistent avec une nécrose hépatocytaire faible. *In vitro*, la transfection de l'ADN du virus de l'hépatite B dans des lignées d'hépatocarcinome bien différenciées permet d'obtenir une répllication virale complète et la production de particules infectieuses sans effet cytotoxique dans la majorité des expériences rapportées. L'ensemble des résultats suggère que c'est la réponse immunitaire et en particulier la réponse immunitaire cellulaire (lymphocytes T cytotoxiques : CTL) qui entraîne la nécrose hépatocytaire. Les antigènes "cibles" sont les antigènes viraux exprimés sur la membrane des hépatocytes dans le contexte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA).

Figure 3 : Transcription du VHB



Plusieurs antigènes du virus de l'hépatite B sont des cibles potentielles : l'antigène de capsid HBC a été particulièrement étudié ; il est exprimé sur la membrane des hépatocytes et des anticorps anti HBC pourrait moduler l'expression de cet antigène et donc la réponse immunitaire. Le passage transplacentaire des anticorps anti HBC a été ainsi proposé comme un des mécanismes intervenant dans la tolérance au virus de l'hépatite B lors d'une contamination à la naissance. Plus récemment, des arguments obtenus à partir d'expériences sur des souris transgéniques contenant une partie ou la totalité du génome VHB ont conduit à "cartographier" des épitopes de l'antigène de surface HBs comme une cible importante pour la réponse immunitaire cellulaire.

Un certain nombre d'arguments font penser cependant que le virus de l'hépatite B pourrait également avoir un effet cytotoxique direct sur l'hépatocyte :

- Dans des expériences de transgénèse, l'introduction des séquences codantes pour la grande protéine d'enveloppe (PréS1-PréS2-S) sous le contrôle d'un promoteur hétérologue a permis d'obtenir une accumulation dans les cellules de cette grande protéine, entraînant une nécrose hépatocytaire. En l'absence de phénomène inflammatoire, la nécrose déclenche une régénération hépatocytaire qui progressivement aboutit à l'apparition de nodules d'hépatocarcinomes. L'aspect des hépatocytes de ces souris transgéniques est semblable à celui d'hépatocytes en "verre dépoli" tels qu'ils ont été décrits chez certains porteurs chroniques du virus B. Ces "verres dépolis" correspondent en fait à l'accumulation dans les membranes du réticulum endoplasmique granuleux de l'antigène HBs stocké en excès. Il faut de plus préciser que cet effet pathologique qui induit la carcinogenèse n'a pas été obtenu dans des souris transgéniques exprimant les protéines moyenne et majeure. Enfin, ce modèle de souris transgénique reste un modèle très particulier et ne reflète pas nécessairement ce que l'on observe chez les porteurs chroniques du virus B.

- Un second type d'arguments est basé sur des cultures cellulaires : dans certains clones de cellules HepG2 transfectées avec l'ADN du virus B une accumulation d'antigène de capsid pourrait se produire et entraîner à une cytotoxicité directe.

Au total : la réponse immunitaire reste essentielle dans la détermination de la nécrose mais il est possible que l'on puisse approfondir dans les années qui viennent des mécanismes de cytotoxicité directe liée à certaines protéines virales.

Par ailleurs, un défaut de production d'interféron alpha est fréquemment constaté chez des sujets chroniquement infecté par le virus de l'hépatite B et l'infection virale B pourrait directement intervenir dans une diminution de réponse à l'interféron alpha.

Tropisme du virus de l'hépatite B

Les infections par le virus de l'hépatite B sont essentiellement à tropisme hépatocytaire. L'utilisation des techniques d'hybridation a cependant clairement montré que les séquences d'ADN du virus de l'hépatite B peuvent être trouvées dans différents types cellulaires. Les séquences d'ADN viral ont en effet été détectées dans le pancréas, le rein, la peau. De plus des séquences d'ADN sont très fréquemment identifiées, au stade aigu comme au stade chronique de l'infection virale, dans des cellules mononucléées du sang périphérique et de la moelle osseuse. En fait, dans le modèle expérimental de la marmotte, les cellules de la moelle osseuse sont les premières dans lesquelles on peut identifier l'ADN du virus de l'hépatite de la marmotte, avant la détection des séquences d'ADN dans le foie.

Dans le sang périphérique, l'ADN du virus de l'hépatite B a été identifié dans les différentes sous populations (monocytes, lymphocyte B, lymphocytes T : CD4+ et CD8+). Dans un second temps des séquences d'ARN ont été également détectées dans les cellules monocléées de sujets infectés par le VHB.

Deux travaux ont par ailleurs rapporté la présence de séquence d'ADN viral dans le sperme : il ne s'agit pas seulement de la détection dans le liquide séminal mais également de forme de haut poids moléculaire dans les spermatozoïdes. Ce résultat, s'il pouvait être confirmé, aurait évidemment une importance, par analogie avec le risque de transmission verticale de certains rétrovirus.

D'une façon générale les formes de réplication de l'ADN du virus B ne sont pas détectées ou sont très minoritaires dans les cellules non hépatocytaires. Cependant la stimulation par des mitogènes peut permettre chez la marmotte de détecter des formes de réplication dans les cellules monocléées du sang périphérique. Très récemment il a été possible de montrer que, dans la lignée monocyttaire U937, la transfection de l'ADN du virus de l'hépatite B pouvait conduire à une réplication virale complète et ce système pourrait permettre une autre approche de l'étude de la réplication virale. En ce qui concerne la moelle osseuse, il faut rappeler que la première démonstration de l'infection par le virus de

l'hépatite B des cellules monocluées a été obtenue par Romet-Lemonne grâce à l'immortalisation par le virus d'Epstein-Barr de cellules monocluées provenant de la moelle osseuse d'un sujet infecté par le virus de l'hépatite B. Dans ces conditions la lignée obtenue a produit au moins de façon transitoire des particules virales B complètes.

Les implications de ces localisations extra-hépatiques ne sont toujours pas clarifiées. En particulier aucune étude n'a pu démontrer un retentissement sur la fonction de ces différents types cellulaires. La présence de séquences d'ADN du virus B dans les cellules monocluées pourrait cependant avoir plusieurs implications :

- rôle de "réservoir" de séquences virales (favorisant en particulier les réinfections après greffe du foie) ;
- modification de la réponse immunitaire chez les porteurs chroniques du virus ou interactions avec d'autres virus lymphotropes (comme HIV) ;
- enfin, l'infection par le virus de l'hépatite B des cellules de moelle osseuse a été proposée par certains auteurs pour expliquer chez certains sujets le déclenchement d'aplasies post-hépatitiques B.

La famille des hépadnavirus

Le virus de l'hépatite B est le prototype d'une famille virale bien particulière dont les membres ont en commun une organisation génétique et un cycle répliatif semblables et la capacité d'induire chez leurs hôtes naturels des infections chroniques, associées à des hépatites chroniques et des hépatocarcinomes pour certaines.

A l'heure actuelle, en plus du VHB, quatre virus font partie de la famille des hépadnavirus : le virus de la marmotte (WHV=woodchuck hepatitis virus), de l'écureuil (GHSV= ground squirrel hepatitis virus), du canard de Pékin (DVHB=duck hepatitis virus) et du héron. Chaque virus a un hôte qui lui est spécifique, mais peut cependant infecter des animaux phylogénétiquement proches, comme certaines espèces de primates en ce qui concerne le VHB, la marmotte pour le GSHV ou le canard col-vert pour le DVHB.

Les pathologies associées aux différents hépadnavirus sont variables en fréquence. Les tumeurs du foie se développent chez 100% des marmottes inoculées expérimentalement à la naissance. Le délai moyen d'apparition des tumeurs est de 2-3 ans. Les tumeurs peuvent également être identifiées chez les écureuils infectés mais leur temps d'apparition est plus long (supérieur à 4-5 ans) . Par contre la situation est bien différente pour le virus du canard : des lésions n'ont été observées que dans certaines régions

géographiques (Japon, Quidong, Chine Populaire) et la prévalence des hépatocarcinomes est beaucoup plus faible. L'absence habituelle de lésions hépatiques chez les canards de la même origine infectés par le même virus aux Etats-Unis semble indiquer que celui-ci est un bon modèle d'interaction entre facteurs viraux et autres facteurs d'environnement (en particulier carcinogènes chimiques). Les études récentes n'ont cependant pas pu démontrer dans ce modèle de synergie entre intoxication par l'aflatoxine B1 et infection par le virus de l'hépatite du canard. Le virus aviaire est le plus divergent de tous. La morphologie de ses particules est atypique et le génome encapsidé est le plus souvent totalement double brin. L'organisation génique est tout à fait particulière : la région X est absente et la région C est plus longue.

Organisation génétique de l'ADN du virus B

Dans le virus VHB, isolé du sang des malades, le génome viral est inséré dans une capsidie formée uniquement de la protéine core avec laquelle il interagit directement. Cette capsidie est entourée d'une enveloppe lipoprotéique contenant trois protéines virales dénommées "grande", "moyenne" et "majeure" (car elle est 10 fois plus abondante que les deux autres).

La détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN du virus B a montré que celui-ci a une taille de 3,2 kb et est extrêmement compact, comportant 4 phases ouvertes de lecture qui se chevauchent dans la même orientation transcriptionnelle (Figure 3).

On distingue 4 gènes principaux :

– Gène Prés/S codant pour les 3 protéines de surface :

. S pour la protéine majeure ;

. Prés2/S pour la protéine moyenne ;

. Prés1/Prés2/S pour la grande protéine.

– Gène PréC/C : la région PréC code pour une séquence signal nécessaire à l'insertion dans les membranes du reticulum endoplasmique d'un peptide de 25KD ; après maturation (protéolyse en N et C terminal) un peptide de 15-16KD est sécrété sous forme soluble dans le plasma et porte les déterminants AgHBe. En l'absence de cette séquence signal (initiation au codon start du C et non du PréC), l'antigène HBc est synthétisé, protéine cytoplasmique de 21KD qui s'assemble pour former la capsidie virale.

– Gène P : il code pour la polymérase virale. Celle ci est formée de trois domaines fonctionnels et d'un domaine non fonctionnel dans l'ordre

suivant : protéine terminale qui est la protéine servant d'amorce à l'initiation de la synthèse du brin (-), région intermédiaire non essentielle ("spacer"), réverse transcriptase/ADN polymérase, et RNase H. Ces deux derniers domaines possèdent une homologie avec les domaines correspondants des rétrovirus, mais le gène Pol n'a pas de région d'homologie avec l'intégrase ni avec la protéase rétrovirale.

- Gène X : codant pour la protéine X qui possède une fonction transactivatrice s'exerçant sur des promoteurs VHB et hétérologues (voir chapitre suivant).

On a également décrit une phase ouverte de lecture, en orientation opposée, dans la région X mais sans codon d'initiation (ORF5) dont le rôle n'est pas connu.

Il est à noter que cette capacité codante couvre la totalité du génome et que les séquences régulatrices sont également des séquences codantes.

Pénétration et répllication de l'ADN VHB du virus B

Les hépadnavirus répliquent leur génome par reverse transcription d'un intermédiaire ARN, dénommé ARN pré-génomique. Les mécanismes de pénétration du virus B dans l'hépatocyte restent tout à fait mystérieux. Sur la particule virale, plusieurs arguments indiquent que la région N-terminale de la grande protéine (région N-terminale de PréS1) a un rôle important. Des anticorps dirigés contre les amino acides 21-47 peuvent en effet inhiber la fixation de la particule virale sur des membranes d'hépatocytes. Il est probable que d'autres domaines de la protéine d'enveloppe interviennent également, à la fois dans les régions PréS2 et S.

En ce qui concerne la molécule qui, sur la membrane de l'hépatocyte, intervient dans cette interaction on ne dispose que de peu d'informations : on a évoqué récemment le rôle du récepteur pour les immunoglobulines de classe A ou du récepteur pour des lipoprotéines. Très récemment le rôle du récepteur pour les asialoglycoprotéines a été également discuté.

Répllication de l'ADN VHB

Après entrée dans la cellule, le génome partiellement double brin et sous forme circulaire ouverte est transférée dans le noyau. Le génome est converti dans une forme superenroulée (supercoiled) circulaire fermée. Cette forme d'ADN viral va servir de matrice à la transcription d'un ARN "pré-génome" de taille plus grande que le génome. Cet ARN pré-génome est transféré dans le cytoplasme et immédiatement encapsidé

dans les protéines de capsid. La reverse transcription de l'ARN pré-génome en ADN est initiée par "une protéine terminale" codée par le gène Pol, permettant la synthèse du brin (-) d'ADN VHB. A partir de ce brin (-) est synthétisé le brin (+) grâce à l'activité ADN polymérase de la polymérase.

Parallèlement, les ARN codants pour les protéines d'enveloppe et de capsid sont transcrits à partir de la forme superenroulée. Les capsides sont secondairement associées à l'enveloppe pour former des virions matures exportés du foie dans le sang et contenant un génome partiellement double brin dont la synthèse du brin (+) est plus ou moins complète.

La forme superenroulée semble jouer un rôle important dans la persistance de l'infection virale. L'amplification de cette forme permet d'établir une réserve importante de matrices pour la transcription. Il existe un phénomène de rétrocontrôle négatif qui permet d'en limiter l'accumulation. En effet dans le modèle du virus du canard, il a été montré que des délétions dans la région PrÉS entraînaient une accumulation de cette forme superenroulée. Il semble donc qu'une fraction des capsides nouvellement synthétisées, puisse recirculer vers le noyau et permettre la reconstitution d'une réserve d'ADN superenroulé.

Les transcrits du virus B

Dans les foies chroniquement infectés et dans les lignées cellulaires permettant une réplication virale active, on peut détecter deux transcrits majeurs de 3,5 et 2,1 kb et deux transcrits mineurs de 2,4 et 0,8 kb. Ces transcrits polyadénylés sont colinéaires avec le génome viral et complémentaires au brin d'ADN (-). Ils possèdent des extrémités 5' hétérogènes et un site de terminaison commun dans le gène de capsid, en aval d'un signal de polyadénylation original partagé par tous les hepadnavirus.

Deux sous-groupes d'ARN distincts peuvent être distingués dans les transcrits de 3,5 kb : les plus longs codent pour le polypeptide PréC/C (HBeAg) qui n'a pas de fonction essentielle pour la réplication virale. Les plus courts en revanche servent d'ARNm pour la synthèse de la protéine de capsid et, par initiation interne de la traduction, pour la protéine P. De plus après l'assemblage avec les produits de ces gènes en particules de capsid, cet ARN devient une matrice pour la reverse transcription. Les transcrits de 3,5 kb présentent des extrémités redondantes sur 120 nucléotides : ils sont en effet initiés en amont du

signal de polyadenylation déterminant l'extrémité 3' de tous les ARN viraux, et ce signal apparaît être ignoré au premier passage de la polymérase.

Deux transcrits de 2,1kb (majeur) et de 2,4 kb (mineur) codent pour les trois protéines d'enveloppe. Les protéines majeures et moyennes sont synthétisées à partir du transcrit de 2,1 kb qui présente plusieurs sites d'initiation, localisés soit en 5' du codon ATG de la région PréS2, soit en 3' et générant un transcrit codant uniquement pour la protéine majeure S. La synthèse de ces différentes espèces d'ARN, regroupés sous la taille de 2,1 kb, est sous contrôle d'un promoteur unique (le promoteur S), sans motif "TATA" et qui présente d'autres ressemblances avec le promoteur tardif du virus SV40 (prototype de promoteur dirigeant la synthèse d'ARN à extrémités 5' hétérogènes).

L'ARN de 0,8 kb, codant pour la protéine X, a été avant tout détecté dans des cellules en cultures transfectées avec l'ADN viral. Son taux est beaucoup plus faible *in vivo*, suggérant que le promoteur X est soumis à une régulation négative durant le processus de réplication. Cette observation est renforcée par la détection de très faibles concentrations de la protéine X dans les foies humains infectés. L'activité du promoteur X dépend d'éléments constitutifs de l'enhancer I avec lequel il est intriqué. Le promoteur foie-spécifique dirigeant l'expression des ARN de 3,5 kb est constitué d'un élément basal riche en résidus A et T et se superpose aux séquences composant l'"enhancer II".

ARN épissés

Récemment, à côté des ARN majoritaires non épissés ont été identifiés deux ARN épissés. Ces ARN ont été détectés dans des lignées après transfection de l'ADN VHB et *in vivo* dans le foie de sujets infectés. Récemment, notre laboratoire a pu montrer que certains de ces ARN épissés pouvaient *in vivo* être reverse-transcrits en une molécule d'ADN complémentaire; cet ADN complémentaire est encapsidé et ce phénomène conduit à la sécrétion dans le plasma de particules défectives VHB dont le rôle est actuellement testé.

Séquences régulatrices

Les séquences permettant la régulation d'expression des différents gènes viraux ont été maintenant bien identifiés. Très schématiquement, on distingue deux séquences "enhancers" : enhancer I et enhancer II. Ces enhancers confèrent une expression tissu-spécifique aux gènes C et PréS1.

De plus des séquences de réponse aux glucocorticoïdes ont été identifiées dans le gène S qui pourraient rendre compte de certains effets des corticoïdes sur l'expression du génome VHB.

Analogies avec les rétrovirus (surtout rétrovirus de type *Cmurins*)

Plusieurs analogies sont notées entre le virus de l'hépatite B et les rétrovirus :

Au niveau de l'organisation génétique :

- Organisation fonctionnelle C-P-S (nucléocapside-polymérase-enveloppe) comme Gag-Pol-Env des rétrovirus.
- Homologie de séquence dans 4 régions :
 - . région centrale de P - polymérase rétrovirale,
 - . région C-terminale de C - région C-terminale de p30 gag,
 - . région N-terminale de C - protéase rétrovirale,
 - . région "U5 like" (dans l'ORF PréC) - U5 du LTR rétroviral.
- Pour le gène X : pas d'homologie de séquence, mais comme pour les v-onc des rétrovirus et le gène Tax de HTLV1, l'usage des codons est celui des génomes des cellules eucaryotes et non des virus des cellules eucaryotes à la différence des autres gènes d'VHB. Ceci a fait suggérer une origine cellulaire récente de ce gène.

Au niveau de la réplication :

- Réverse transcription d'un ARN pré-génome.
- Dégradation de l'ARN au fur et à mesure de la synthèse de l'ADN.
- Utilisation d'un oligoribonucléotide comme amorce de la synthèse du 2ème brin d'ADN.
- Synthèse asymétrique des deux brins d'ADN.

Cependant, différence essentielle, les hépadnavirus n'ont pas besoin de s'intégrer dans le génome cellulaire pour leur réplication.

Variabilité génétique du virus de l'hépatite B

Elle a été pendant longtemps sous-estimée. Mais peut être maintenant mieux appréciée grâce à des études comparatives de séquences : une comparaison de 32 isolats différents a permis de montrer un taux de substitution de $4,57 \times 10^{-5}$ /nucléotide/an. Une étude comparative des séquences d'ADN viral isolé à différentes périodes de l'évolution d'une infection chronique a mis en évidence un taux de substitution dans le gène de capsid d'environ $2,2 \times 10^{-5}$ /nucléotide/an. Ces résultats sont environ

100 fois supérieurs à ceux observés pour un virus à ADN du groupe des Herpès virus et environ 100 fois inférieurs à ceux observés pour des rétrovirus. Ils montrent que la variabilité génétique du VHB est supérieure à celle des virus à ADN "classiques", probablement du fait de l'utilisation de la reverse transcriptase pour la réplication du génome viral.

Le développement de la technique d'amplification génomique (Polymerase chain reaction ou PCR) a permis un accès beaucoup plus rapide à des séquences nucléotidiques partielles d'un grand nombre d'isolats d'ADN du virus B de malades atteints de différentes formes d'hépatopaties. Un certain nombre de mutations ont été ainsi décrites dont les implications restent cependant à préciser.

Nous décrivons dans ce chapitre les mutations identifiées chez des sujets positifs pour l'antigène de surface dans le sérum, atteints d'infection aiguë ou chronique.

Mutations dans les séquences PréC/C

Une mutation G/A au nucléotide 1896, qui crée un codon stop (TAG) a été maintenant décrite de façon très fréquente. Cette mutation interrompt la phase ouverte de lecture PréC/C au codon 28 ; elle empêche donc la synthèse de l'antigène HBe. Cette mutation a été décrite initialement en Italie et en Grèce mais les études récentes montrent qu'on peut l'identifier dans de nombreux autres zones géographiques comme la France, l'Allemagne, la Bulgarie, le Japon et Israël. Ce n'est cependant pas une observation constante puisqu'elle n'a été que rarement identifiée chez des malades d'Afrique du Sud.

La plupart des patients sont infectés par un mélange entre une forme sauvage et une forme mutée et les proportions respectives de ces deux molécules vont varier au cours de l'infection virale.

Plusieurs études ont décrit une association entre la mutation PréC1896 et une maladie sévère du foie. Au stade d'infection chronique en effet, des hépatites sévères, résistant au traitement par interféron alpha, ont été décrites en Italie et en Grèce. Les patients infectés de façon prédominante par une forme mutée auraient des taux plus élevés de transaminases et une virémie augmentée, comparativement à ceux infectés majoritairement par une forme sauvage. Dans ces études, les différences observées ne sont apparemment pas expliquées par la durée de l'infection ou l'âge des patients.

Un fait constant retrouvé dans la quasi totalité des études est la relation entre l'existence ou l'absence de cette mutation PréC et la durée du portage chronique : la mutation PréC est beaucoup plus fréquemment identifiée après une évolution prolongée de l'infection VHB, qu'il s'agisse d'une évolution spontanée ou après traitement par interféron alpha. En ce qui concerne l'interféron alpha, plusieurs études ont montré une sélection des mutants PréC durant le traitement mais ce point n'est pas constant.

Au stade aigu de l'infection cependant, des mutations PréC peuvent être également identifiées lorsqu'il s'agit d'hépatites à évolution grave. Dans plusieurs études, réalisées au Japon et en Israël, les mutants PréC n'ont pas été détectés chez des patients avec hépatites bénignes bien que de nombreux clones aient été analysés pour chaque échantillon. Au contraire, le codon stop 1896 était mis en évidence chez des patients avec hépatite fulminante aiguë, due à une transmission transfusionnelle, sexuelle ou intrafamiliale. De façon très intéressante, le mutant a été identifié dans certaines de ces études à la fois chez le contaminant et chez les receveurs. L'analyse de nombreux clones a permis de montrer que chez les deux individus la forme mutée était bien la forme majoritaire. Une étude récente en France de notre groupe et une étude américaine n'ont cependant pas permis de détecter au stade d'hépatite grave ce mutant : il existe donc des variations géographiques importantes.

Les résultats que nous avons décrit suggèrent une association entre la présence de cette mutation PréC et la sévérité de la maladie du foie. D'autres études ont cependant présenté des résultats discordants. La même mutation PréC peut être identifiée chez des sujets parfaitement asymptomatiques et ce de façon prolongée ; cette observation a été faite en Israël, au Japon, en Indonésie et en Italie. En Italie en particulier une étude sur une période de 10 ans, incluant des biopsies du foie répétées, a montré la présence de la mutation PréC chez des individus ayant une histologie hépatique pratiquement normale. Ces résultats indiquent donc que la mutation PréC1896 ne peut être considérée comme seule responsable d'une évolution particulière mais qu'il existe plutôt une intrication entre différents facteurs (facteurs de l'hôte et facteurs viraux) qui interviennent dans la sévérité de la maladie du foie. De plus c'est probablement la combinaison de plusieurs mutations sur les différents gènes viraux qui est responsable, comme cela a été montré dans d'autres infections comme le HIV, d'un phénotype particulier.

Autres mutations PréC/C :

Plusieurs mutations sur la séquence PréC ont été décrites secondairement : elle incluent en particulier une mutation sur le premier nucléotide du codon d'initiation de traduction du PréC et des codons stop au position 1817 et 1874. Toutes ces mutations ont en commun, comme pour la mutation 1896 l'absence de synthèse d'antigène HBe.

En ce qui concerne les cancers primitifs du foie très peu d'études se sont attachées à rechercher ces mutations dans les tumeurs. Dans une étude récente cependant, réalisée en Italie, la mutation PréC 1896 a été mise en évidence dans 9/9 tissus cirrhotiques adjacents à la tumeur chez des sujets atteints de cancers du foie sur cirrhose antigène HBs positive ; au contraire, la mutation PréC chez ces mêmes individus n'était mise en évidence dans aucun des tissus tumoraux. De plus une mutation au codon 24 de la séquence PréC était mise en évidence dans le tissu tumoral, mutation qui éliminait une cystéine et pourrait donc modifier la conformation de la protéine.

Mutations sur le gène C

Plus récemment des mutations sur le gène C ont été décrites par plusieurs groupes. Des mutations situées entre les nucléotides 2150 et 2254 et 2062 à 2192 ont en particulier été décrites avec une grande fréquence chez des patients avec hépatite chronique active mais étaient absentes chez des sujets porteurs asymptomatiques.

De façon intéressante une mutation sur le codon 12 du gène C semble fréquemment associée à la mutation PréC1896 chez des sujets atteints d'hépatite chronique active ou d'hépatite fulminante. L'association de certaines mutations sur les deux phases ouvertes de lecture pourrait donc être déterminante dans certains cas pour le phénotype viral.

Mutation sur les gènes PréS/S

Des mutations PréS/S ont été identifiées sur plusieurs isolats au Japon et en Europe. Notre groupe a pu ainsi décrire deux mutants caractérisés par des mutations ponctuelles nombreuses et des délétions dans les phases ouvertes de lecture PréS1, PréS2 et S. Dans un cas ces réarrangements PréS étaient associés à une insertion dans le gène C et à la mutation PréC 1896. Des études prospectives chez un même malade ont permis de montrer des arguments pour la sélection progressive au cours de l'infection chronique de ce type de mutant.

Les mutations sur les gènes d'enveloppe interviennent également dans ce qui a été récemment décrit sous le terme de "escape mutants". Ces mutants ont été identifiés initialement en Italie, Gambie et Japon au cours du suivi de programmes d'immunisation chez des enfants qui ont eu une vaccination complète et avaient développé des anticorps anti HBs à un taux apparemment satisfaisant ; ils ont cependant été secondairement identifiés comme antigène HBs positifs. L'analyse de la séquence du gène S montre des mutations ponctuelles sur les acides aminés 145 et 126. Ces acides aminés font partie du déterminant antigénique "a", déterminant majeur pour l'apparition d'anticorps neutralisants. Les mêmes observations ont été réalisées chez des sujets ayant subi une transplantation hépatique pour cirrhose antigène HBs positive et traités par un anticorps monoclonal anti HBs pour prévenir la réinfection de l'infection VHB. Ces résultats, bien qu'ils concernent un nombre limité d'individus actuellement, suggèrent que des mutations ponctuelles dans un déterminant antigénique majeur pourraient permettre au virus "d'échapper" à la protection liée à la vaccination.

Ces résultats seront bien sûr à prendre en compte dans les stratégies ultérieures de vaccination.

Les implications potentielles de ces mutations.

Modification d'épitopes impliqués dans la réponse immunitaire au virus.

La sélection de certains mutants, mise en évidence au cours de l'infection chronique, suggère des modifications de conformation de certains déterminants majeurs des protéine d'enveloppe et de capsid. Plusieurs des mutations qui ont été décrites sont en effet localisées dans des épitopes qui avaient été préalablement décrits comme impliqués dans les réponses lymphocytaires T et B.

On peut citer en particulier des épitopes codés par la région C terminale du gène PrÉS1 et la partie N terminale du gène PrÉS2. De plus dans le gène S on a vu que des mutations ponctuelles dans la séquence codant pour le déterminant antigénique a pourraient conduire à une absence de protection. Des mutations sur le gène C pourraient aussi avoir un rôle important dans la réponse immunitaire au virus puisque une réponse de type lymphocytaire cytotoxique a été mise en évidence vis-à-vis de la protéine de capsid.

L'interprétation des mutations mises en évidence sur la séquence PréC est difficile actuellement : elles suppriment la synthèse de l'antigène HBe et celui-ci a été impliqué dans les phénomènes de tolérance immunitaire tels qu'on peut les voir dans l'infection du nouveau-né par une mère infectée. On considère en effet que l'antigène HBe, après passage transplacentaire, induit une tolérance au virus qui explique le développement très fréquent d'un portage chronique chez le nouveau-né. Cependant, d'un autre côté, l'antigène HBe est également une cible pour une réponse immunitaire cellulaire et humorale et l'absence de synthèse de l'antigène HBe pourrait favoriser, au cours d'une infection chronique chez l'adulte, une sélection de ces variants qui ne seraient pas reconnus par la réponse immunitaire. Enfin la mutation PréC au nucléotide 1896 peut conduire à la synthèse d'un peptide tronqué qui pourrait être une nouvelle cible pour une réponse lymphocytaire cytotoxique; récemment la synthèse *in vivo* d'un tel peptide dans le foie d'un sujet infecté par un variant PréC a été démontrée.

Effet cytotoxique direct des protéines virales sur les cellules infectées

Des arguments indirects suggèrent que certaines protéines, et en particulier la protéine de capsid HBC, pourraient avoir un effet cytotoxique direct dans certaines situations. Il est donc plausible que certaines des mutations conduisent à la synthèse de nouvelles protéines qui pourraient avoir un effet cytotoxique et/ou modifier par transactivation l'expression de certains gènes cellulaires. Certaines de ces protéines pourraient en particulier intervenir en modifiant la réponse de la cellule à l'interféron.

Modification d'expression des gènes du virus B et de la réplication du génome viral

Il est important de réaliser que, du fait de la structure très compacte du génome viral, les mutations que nous avons décrites vont modifier des éléments de régulation d'expression des différents gènes viraux et de réplication du génome viral. C'est ainsi que la région PréC se superpose à la séquence qui est nécessaire pour l'encapsidation de l'ARN pré-génomique. De même, des mutations sur la région PréS vont modifier la régulation d'accumulation de la forme superenroulée de l'ADN viral : il a en effet été montré, dans le système du virus du canard, que des mutations dans le domaine PréS vont entraîner une accumulation de cette

forme superenroulée dans le noyau ; la forme superenroulée est probablement impliquée dans la persistance de l'infection virale et des mutations PrÉS peuvent donc considérablement modifier le cycle biologique du virus.

Enfin les séquences PrÉS/S sont impliquées dans la pénétration de la particule de Dane dans l'hépatocyte et là encore des mutations peuvent considérablement modifier l'infectiosité du virus mutant.

En résumé : chacune des mutations décrites peut avoir un effet pleiotrope. C'est probablement la combinaison de différentes mutations sur le génome viral qui peut déterminer un phénotype particulier. Lè encore, c'est également la balance entre ces variations génétiques et la réponse immunitaire de l'individu qui détermineront le profil évolutif de l'infection par le virus B.

Virus de l'hépatite C

Généralités

Le problème des hépatites Non-A, Non-B est devenu un problème important de santé publique en France. L'incidence des hépatites post transfusionnelles restait élevée malgré l'exclusion du don du sang des sujets infectés par le virus de l'hépatite B. On pouvait estimer à en effet 6 à 10% l'incidence d'hépatites post transfusionnelles qui étaient, de façon quasi exclusive, liées à des virus Non-A, Non-B. Une infection par le virus Non-A, Non-B (hépatite post-transfusionnelle ou sporadique) entraîne fréquemment (50 à 60 % des cas) un portage chronique du virus. Cette infection chronique est fréquemment associée à une hépatite chronique active qui elle-même peut induire l'apparition d'une cirrhose. Enfin un cancer primitif du foie peut compliquer l'évolution de cette cirrhose.

Le virus de l'hépatite C a été récemment identifié par la compagnie Chiron et par plusieurs laboratoires. C'est l'agent étiologique majeur de ces infections, repérées initialement comme "Non-A, Non-B". Elles regroupent en fait maintenant plusieurs entités virales différentes :

- virus de l'hépatite C ;
- virus de l'hépatite B chez des sujets séronégatifs : infections non décelées à l'aide des réactifs immunologiques classiques, néanmoins repérées par détection de l'ADN viral ;
- virus de l'hépatite E (VHE) (Transmission par voie entérale) ;
- autres virus non encore identifiés ?

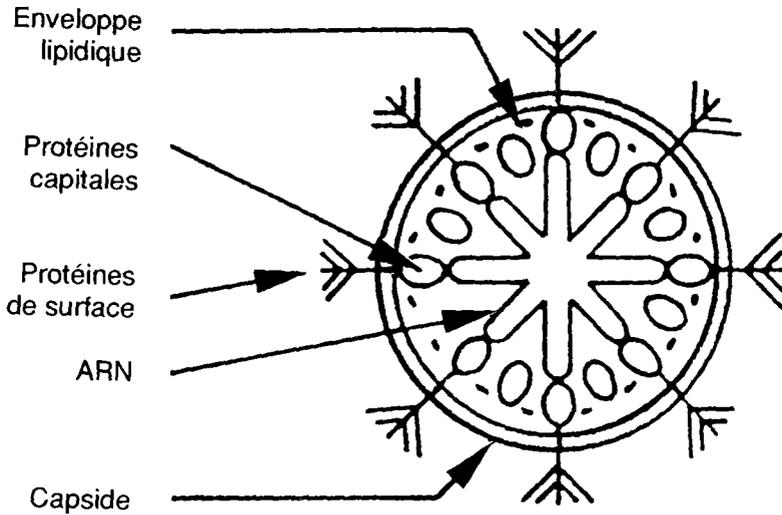
Le virus de l'hépatite C est essentiellement transmis par des transfusions de sang et les injections intraveineuses des toxicomanes. Par contre la transmission sexuelle est d'une importance beaucoup plus faible que pour le virus de l'hépatite B.

Le virus de l'hépatite E est l'agent étiologique majeur des hépatites Non-A, Non-B à transmission entérale.

Le virus de l'hépatite C (Figure 4) a été identifié grâce à deux approches complémentaires :

- expériences de transmission aux chimpanzés ;
- réalisation de banques d'expression d'ADN complémentaires à partir d'ARN purifiés de plasma infectieux. Ces banques d'expression ont été criblées en utilisant le sérum de sujets soit avec une hépatite chronique Non-A, Non-B, soit convalescents d'une infection Non-A, Non-B.

Figure 4 : Structure du virus de l'hépatite C



Ces approches ont permis le clonage, séquençage et expression de plusieurs ADNc qui ont été identifiés par la suite comme représentant une partie du génome du virus C.

Le génome du virus C est un ARN simple brin, codant, d'environ 10kb. Son organisation génétique montre des homologies significatives avec le groupe des Flavivirus (essentiellement virus de la dengue type 2) et les Pestivirus. De plus on peut retrouver certaines homologies de séquence avec des virus de plantes. Deux régions distinctes sont présentes : en 5' la région structurale inclut des gènes codant pour la capsidie et l'enveloppe. En 3' la région non structurale (NS2 à NS5) inclut des protéines impliquées en particulier dans la réplication du génome viral.

La séquence nucléotidique complète de plusieurs génomes du virus a maintenant été déterminée en utilisant des isolats provenant de différentes zones géographiques.

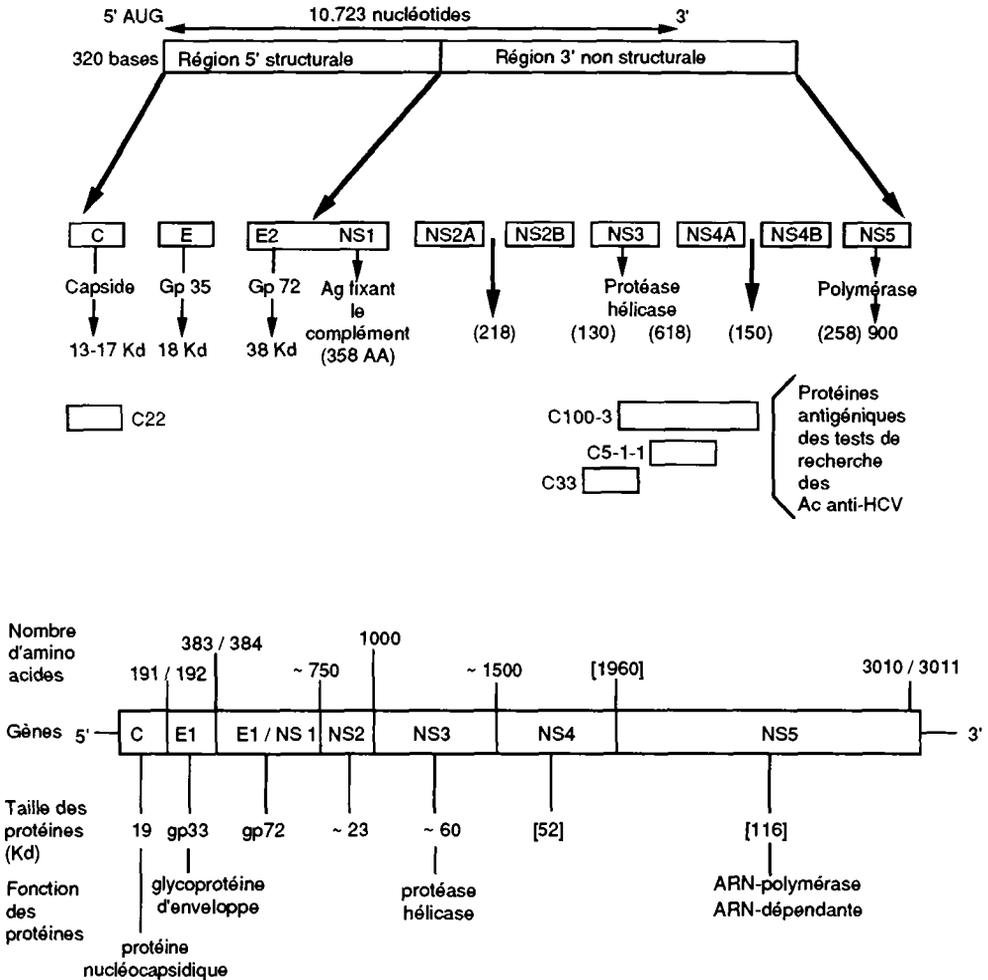


Figure 5 : Organisation structurale du virus de l'hépatite C

Les résultats peuvent être résumés de la façon suivante (Figure 5) :

- Il existe dans la région 5' du génome viral une région appelée "5' non codante" (5' UTR) très conservée parmi les différents isolats et qui pourrait intervenir dans la régulation d'expression des protéines du virus C.

- La région dite non structurale coderait pour des protéines impliquées dans la réplication virale, elle est relativement conservée parmi les différents isolats. La région NS3 code pour une hélicase/protéase et la région NS5 code probablement pour la RNA Polymérase-RNA dépendante.

- La région structurale code pour les protéines de capsid (C) et d'enveloppe (E1 et E2/NS5). Les séquences codant pour les protéines d'enveloppe sont beaucoup moins conservés. Des régions hypervariables ont été identifiées dont l'une en particulier, située en 5' de la séquence E2/NS1, présente des analogies de structure avec la boucle V3 de la séquence du virus HIV.

L'étude comparative des séquences nucléotidiques, sur une période de 8 et 13 ans chez un humain et un chimpanzé chroniquement infectés, a montré que le taux de mutation était environ de $1,44 \times 10^{-3}$ /site/an.

Une classification est maintenant proposée en 5 génotypes. La divergence entre différents isolats d'un même génotype est inférieure à 10% alors que des divergences de l'ordre de 20 à 30 % dans les séquences nucléotidiques peuvent être observées entre les différents génotypes, pour les protéines d'enveloppe.

Variabilité génétique du VHC

Des résultats récents suggèrent cependant que la classification en 5 génotypes du virus de l'hépatite C ne rend qu'imparfaitement compte de la réalité du problème. En fait, des études de séquences au niveau de la région 5' non codante et au niveau de la capsid montre un très grand nombre de génotypes (jusqu'à une dizaine...) avec des divergences variables. Cette variabilité génétique pose évidemment le problème de la protection contre l'infection virale.

Le Dr Farci (Laboratoire du Pr Purcell) a récemment montré qu'il était possible de réinfecter avec succès un chimpanzé avec la même souche d'VHC, malgré la guérison apparente après la première injection et l'apparition des anticorps anti VHC. Ce type de résultat suggère l'absence d'anticorps neutralisants efficaces chez l'animal infecté et

posera des problèmes dans la perspective de vaccination qui est actuellement en cours d'étude.

Une deuxième implication majeure de la variabilité génétique est de savoir s'il existe des différences en ce qui concerne la gravité de la maladie et la résistance au traitement par interféron suivant le type d'isolat viral. Plusieurs études ont en effet suggéré, à la fois au Japon et en Europe, que certains génotypes (notamment le Type II) sont associés à un taux plus élevés d'ARN du VHC, à une évolution clinique plus sévère et à une moins bonne réponse au traitement par interféron. Là encore, il s'agit d'études préliminaires qui demandent à être confirmées mais qui pourraient avoir des implications pratiques et fondamentales importantes.

L'étude de la biologie du virus nécessitera la reconstruction d'ADN complémentaires de taille complète correspondant à l'ARN du virus C, permettant alors la transfection d'un certain nombre de lignées cellulaires et, possiblement, l'obtention d'une réplication virale complète à un niveau suffisant qui en permettrait une étude détaillée. Ce type d'expérience permettrait également de tester l'effet potentiel de certaines protéines virales sur la transformation cellulaire.

Structure du virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C n'avait jusqu'à très récemment pas été visualisé en microscopie électronique. Il s'agit d'une particule de 40 à 60nm (d'après les expériences antérieures de filtration). Une étude japonaise a pu cependant montrer récemment la détection d'antigène du virus C (antigène de capsid) dans le sérum de malades infectés ainsi que des photos en microscopie électronique du virus. On ne connaît pas actuellement les processus qui conduisent à l'assemblage de la capsid et de l'enveloppe du virus.

Biologie du virus de l'hépatite C

En juin 1993, on ne dispose toujours pas de système de culture *in vitro* du virus de l'hépatite C et l'existence ou non d'un effet cytopathique du virus C n'est pas connu. Des tentatives ont été réalisées en utilisant des hépatocytes en culture primaire de chimpanzés, isolés à partir du foie de chimpanzés normaux. La mise en contact de ces hépatocytes avec des plasmas infectieux a permis d'obtenir des résultats préliminaires encourageants mais encore incomplets : des séquences d'ARN du virus C

(brin positif et brin négatif) sont détectés dans les cellules et dans le surnageant après une dizaine de jours de culture. Des résultats reproductibles ont pu être obtenus et il a été rapporté (mais non publié) qu'un passage serait possible, avec infection successive d'autres cultures primaires d'hépatocytes. De la même manière des cultures primaires d'hépatocytes foetaux humains sembleraient pouvoir avoir été infectés par des plasmas VHC positifs. Une autre approche a été rapportée récemment qui consiste à infecter par des plasmas infectieux une lignée lymphocytaire T humaine (MOLT-4).

Cette lignée, quand elle est préalablement infectée par le rétrovirus de Moloney, semble plus susceptible aux infections virales. La détection de l'ARN du virus C a été possible dans ces cellules, à la fois en PCR et en hybridation *in situ*. Des résultats préliminaires comparables ont été obtenus dans le laboratoire en utilisant des hépatocytes humains et la lignée MOLT-4.

L'ensemble des résultats suggère qu'une infection d'un nombre très limité de cellules (hépatocytes ou lymphocytes) est peut-être possible *in vitro*, mais que ce système de culture ne permet pas d'aborder actuellement le problème de la biologie du virus.

Dans les cellules infectées, la PCR permet de détecter non seulement le brin positif mais également le brin négatif d'ARN du virus C. La signification exacte de ces brins négatifs n'est pas connue. Il pourrait s'agir, par analogie avec les Flavi ou les Pestivirus, de formes de réplication de l'ARN viral. Ces séquences ont été détectées dans le foie et dans des lymphocytes (quand ils sont stimulés par des mitogènes). Des brins négatifs sont également détectés dans le sérum. Il est actuellement discuté de savoir si ces ARN sont effectivement encapsidés dans des particules virales comparables à celles qui contiennent le brin positif ou si, comme cela a été suggéré récemment, ces formes d'ARN négatif dans le sérum étaient associées à des protéines ou des lipides mais non encapsidés. Il est en tout cas certain que la détection de ces brins négatifs dans le sérum ne représente pas en soit un test de multiplication du virus C. Par contre leur présence dans les tissus examinés est un indice de réplication virale.

Tropisme du virus C

On connaît très mal actuellement le tropisme cellulaire du virus de l'hépatite C. Il est certain qu'il infecte les hépatocytes. Un certain nombre de résultats établit que le virus de l'hépatite C peut également

infecter différentes sous-populations de cellules monocluées du sang circulant. Les résultats basés sur les analyses de l'ARN viral sur des cellules monocluées stimulées ou non par différents mitogènes, ainsi que des résultats très préliminaires en hybridation *in situ*, indiquent en effet la possibilité d'infection des monocytes et des lymphocytes (B et T). Ces données restent cependant limitées et l'impact de l'infection par le virus C sur la fonction de ces différents types cellulaires n'est pas connu.

Diagnostic de l'infection VHC

Diagnostic sérologique

Il repose aujourd'hui sur la détection d'anticorps spécifiques de protéines codées par les régions non structurales (NS3-NS4) et structurales (capside). Des RIA et des ELISA ont pu être développés, qui ont permis de préciser plusieurs données épidémiologiques.

– *Au cours des infections aiguës* par le virus (dont la majorité est asymptomatique), la séroconversion est souvent retardée, de l'ordre de six semaines. Ce résultat explique que certains cas risquent de ne pas être diagnostiqués.

Ces sujets peuvent néanmoins évoluer secondairement vers une infection chronique asymptomatique.

– *Au stade d'hépatite chronique* le résultat essentiel a été la démonstration d'une très forte prévalence d'anticorps anti-VHC à la fois chez des sujets atteints d'hépatites post-transfusionnelles et d'hépatites dites sporadiques. Les chiffres varient de 50 à 80% suivant les zones géographiques considérées.

Ce résultat indique donc que le virus C serait responsable d'un très fort pourcentage des hépatites chroniques Non-A, Non-B.

– *Chez des patients avec cancer du foie* : une forte prévalence d'anticorps anti-VHC a également été mise en évidence chez ces sujets.

– *Dans la population générale* il existe des zones à faible prévalence (environ 0,5% de la population générale testée positive) incluant en particulier l'Europe du Nord et des zones à forte prévalence (entre 1 à 1,5% de la population générale testée positive), en particulier en Europe du Sud et au Japon. En France des études réalisées dans les centres de transfusion indiquent un chiffre de 0,68% de donneurs positifs pour l'anti-VHC (Tableau I).

Bien que les tests dits de seconde génération permettant la détection d'anticorps anti-capsides aient permis d'augmenter considérablement la

Tableau I : Fréquence des anticorps anti-VHC chez les donneurs de sang selon les zones géographiques

<ul style="list-style-type: none">• Zones à très forte prévalence : 1 – 1,5 %<ul style="list-style-type: none">– Japon– Europe du Sud• Zones à forte prévalence : 0,6 – 0,8 %<ul style="list-style-type: none">– Europe (France)– États-Unis• Zones à faible prévalence : < 0,3 %<ul style="list-style-type: none">– Australie– Europe du Nord

fiabilité des tests, ceux-ci continuent à poser un certain nombre de problèmes d'interprétation :

- la séroconversion VHC est retardée après une infection aiguë ;
- il existe des sujets séronégatifs mais porteurs chroniques du virus ;
- certains tests sérologiques ont des résultats difficiles à interpréter (RIBA dits "indéterminés") ;
- les anticorps ne permettent pas de bien suivre la transmission mère-enfant dans la mesure où il existe une transmission des anticorps maternels à l'enfant jusqu'au 12ème mois environ ;
- il n'y a pas actuellement de marqueurs sérologiques de multiplication virale et en particulier de test pour la détection des antigènes du virus C.

Détection de l'ARN du virus de l'hépatite C

L'ARN du virus de l'hépatite C est actuellement le seul marqueur direct et sensible de multiplication virale C. Du fait d'une virémie généralement basse (de l'ordre de 10^4 à 10^6 particules/ml) la détection de l'ARN du virus de l'hépatite C dans le sérum, dans des cellules monocluées ou dans le tissu a été jusqu'à présent essentiellement réalisée en utilisant la technique d'amplification génomique ou PCR.

Les différents résultats obtenus peuvent être ainsi résumés :

- *au stade d'infection aiguë*, la virémie C est détectée précocement (3 jours chez le chimpanzé et 1 semaine chez l'homme) et précède la séroconversion. La disparition de la virémie est en règle observée en cas de guérison de l'hépatite aiguë alors que sa persistance est associée au développement d'une infection chronique ;

- *chez des sujets avec hépatite chronique*, un résultat anti VHC positif avec un test de 2^e génération, est le plus souvent associé à une virémie. Environ 80 % des sujets avec hépatite chronique (HCA) anti VHC+ ont en effet un test ARN VHC positif dans le sérum.

Une dissociation est cependant possible entre les résultats de l'anti VHC et de l'ARN du virus C. Dans une étude récente de notre laboratoire, 4 sujets sur 27, avec HCA anti VHC+ étaient ARN VHC négatifs. Il est cependant possible de détecter chez certains de ces individus une virémie intermittente.

- *au cours des traitements antiviraux*, la PCR pourra être également indiquée pour le suivi des patients traités par l'interféron alpha. On peut estimer schématiquement que l'interféron induit une réponse transitoire chez environ 50 % des patients traités (normalisation des transaminases et diminution des signes d'activité histologique) mais qu'une réponse prolongée n'est observée que chez environ 20 à 30 % des sujets. L'interféron alpha entraîne une normalisation rapide des transaminases (environ quinze jours) et la virémie est également immédiatement négativée.

Si la détection de l'ARN du virus de l'hépatite C a de façon indiscutable un réel intérêt diagnostique, la PCR présente un certain nombre de limitations dans son interprétation.

Très récemment, un nouveau test a été proposé qui n'est pas basé sur l'amplification préalable des ARN avant leur détection mais utilise un système de sondes ADN "branchées" qui permet une amplification du signal après hybridation conventionnelle en milieu liquide. Ce test (proposé par la compagnie Chiron) a l'avantage de pouvoir donner une

estimation quantitative des résultats mais présente une sensibilité plus faible que la PCR.

Enfin il faut signaler que certaines équipes ont proposé une détection de l'ARN du virus de l'hépatite C en utilisant un *slot blot* sans amplification préalable du signal et ont rapporté une assez bonne corrélation avec les résultats de la PCR.

D'une façon générale cependant la PCR reste le test le plus sensible et donc l'examen de choix quand la virémie VHC est particulièrement basse.

Antigènes du virus de l'hépatite C : détection dans le foie.

Dans le foie plusieurs études ont rapportés, avec des résultats controversés, la détection d'antigènes VHC codés par la région structurale (capside) ou la région non structurale dans des coupes de foie de sujets infectés. La détection des antigènes reste cependant en pratique difficile et peu reproductible.

De même, des séquences d'ARN du virus C peuvent être détectées dans le foie de sujets infectés mais la quantité de séquences virales et le nombre de cellules qui les contiennent semblent très faibles. Une exception est représentée par une étude réalisée au stade aigu de l'infection chez les chimpanzés ou, en utilisant des sondes oligo-nucléotidiques marquées avec les produits non radioactifs, les auteurs ont détecté un marquage très important sur une proportion forte d'hépatocytes. Cette situation, si elle n'est pas liée à un artefact, serait très particulière du stade aigu de l'infection virale chez les chimpanzés.

Virus de l'hépatite D

Le virus de l'hépatite D (VHD) est un virus défectif seulement identifié chez des patients infectés par le VHB.

Structure

Il s'agit d'une particule sphérique de 36nm de diamètre dont l'enveloppe est constituée par l'enveloppe du VHB, portant les déterminants de l'antigène HBs. Cette enveloppe entoure une nucléocapside qui contient l'antigène HD et l'ARN génomique.

Le génome VHD est un ARN simple brin de 1,75kb. Une phase ouverte de lecture a été identifiée qui permet de coder pour deux polypeptides. L'ARN a une forme circulaire et des structures secondaires très fortes qui lui permettent de se refermer en formant une structure en batonnets. L'ARN VHD se rapproche par son organisation génétique de certains ARN pathogènes de plantes.

Tropisme

L'VHD a un tropisme apparemment uniquement hépatocytaire. La virémie est très forte (environ 10^{11} particules infectieuses/ml de sérum). On peut trouver environ 300 000 molécules d'ARN VHD génomique par cellule hépatique. La réplication se fait par un mécanisme de "rolling-circle".

Le rôle de l'antigène HD dans la réplication de l'ARN viral est discuté ; il n'est pas nécessaire mais pourrait faciliter cette réplication. Comme on l'a vu, il existe deux formes de l'antigène HD : une protéine S de 24kd et une protéine L de 27kd. Un changement de nucléotide au niveau du codon stop en position 1012 expliquerait l'expression de la protéine L à partir de la même phase ouverte de lecture que celle qui code pour la protéine S. La protéine L agirait plutôt comme un répresseur de la réplication et son expression réduit cette réplication ; son expression pourrait donc favoriser le portage chronique du VHD.

Evolution

L'infection VHD peut être compliquée par un portage chronique du virus ; elle est fréquemment associée à des lésions hépatiques sévères.

L'effet du virus D sur la cellule hépatique n'est pas établi. Il est souvent admis que le virus pourrait avoir un effet cytotoxique direct mais des résultats récents montrent que la transfection d'un ADN

complémentaire VHD dans des cellules en culture n'entraîne pas d'effet cytotoxique.

Modes de contamination

Elle suit les voies de contamination du virus B, mais la carte de prévalence des infections delta ne se superpose pas à celle du virus B. On distingue des zones à forte endémie (comme l'Italie du Sud) où la transmission se fait par voie sexuelle et par transmission verticale et des zones à basse endémie (comme l'Europe du Nord) où la prévalence de l'infection VHD est maxima chez les toxicomanes ; la transmission par voie sexuelle intervient alors dans des groupes à risque comme les homosexuels.

Virus de l'hépatite E

Le virus de l'hépatite E (VHE) a été identifié en 1990. En fait, c'est la convergence de deux approches complémentaires qui ont permis cette identification : dès 1983 l'étude de certaines formes d'hépatite Non-A, Non-B épidémiques, ainsi que les expériences d'inoculation aux macaques cynomolgus avaient permis d'identifier en immuno-microscopie électronique dans l'inoculum et dans les selles de volontaires pendant la phase aiguë de l'hépatite des particules virales de 27 à 32nm, reconnues par des anticorps provenant de sérum de patients infectés.

Ces particules ont été également détectées dans le foie et dans la bile de singes infectés. Elles ont une forme icosaédrique, comme le VHA, mais leur coefficient de sédimentation est comparable à celui des calicivirus non enveloppés.

En 1990 un ADN complémentaire a été cloné à partir de la bile de macaque cynomolgus infecté par VHE. Plusieurs génomes viraux entiers ont maintenant été analysés. Le virus de l'hépatite E est un calicivirus, petit virus sans enveloppe, constitué d'un ARN à polarité positive de 7,6 kb ; deux phases ouvertes de lecture (ORF1 ET ORF2) ont été identifiées. La partie 3' terminale de l'ORF2 code pour un épitope qui réagit avec des sérums provenant de patients de différentes épidémies d'hépatite E. La phase ouverte de lecture ORF1 code pour une ARN polymérase ARN dépendante.

Un antigène (AgVHE) a été identifié dans le cytoplasme des hépatocytes de macaques, de chimpanzés et de singes infectés expérimentalement. De plus un test de blocage des anticorps fluorescents a été mis au point pour détecter des anticorps antiVHE dans le sérum de malades. Ce type de tests a permis de détecter des anticorps anti VHE dans 77 à 100% de sérum de patients atteints d'hépatites E et provenant de différentes régions géographiques.

Plus récemment des tests ELISA ont été établis dont la spécificité et la sensibilité sont en cours d'évaluation.

Le degré de variabilité génétique du virus VHE est encore mal connu mais elle semble limitée. Il n'y a pas d'argument pour penser que les épitopes VHE, isolés à partir d'une forme épidémique ne réagiront pas avec les anticorps de patients atteints d'hépatites E dans d'autres régions géographiques.

Tropisme

Le tropisme du virus et son mode de réplication sont très mal connus mais le virus de l'hépatite E semble avoir un tropisme essentiellement hépatocytaire.

Références

1. BRECHOT C. Polymerase chain reaction for the diagnosis of hepatitis B and C viral hepatitis. *J Hepatol* 1993;17(S3):35-41.
2. BRECHOT C, KREMSDORF D. Structure et organisation génétique du virus de l'hépatite C. *Immunoanal Bio Spec* 1991;26:51-5.
3. BROWN JL, CARMAN WF, THOMAS HC. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1992;15:144-8.
4. CHOO QL, RICHMAN KH, HAN JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451-5.
5. CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne Non-A, Non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
6. HOUGHTON M, WEINER A, HAN J, et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses : implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;2:381-8.
7. KANEKO S, MURAKAMI S, UNOURA M, KOBAYASHI K. Quantification of hepatitis C virus RNA by Competitive Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol* 1992;37:278-82.
8. KUO G, CHOO QL, ALTER HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human Non-A, Non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
9. PETERS M, et al. Immunology and the liver. *Hepatology*. 1991;13:977.
10. ROBINSON WS. Hepadnaviridae and their replication. *Virology*, 2nd ed, Piélas BN & Knipe DM (eds). Raven Press Ltd, New-York 1990;76:pp2137-69.
11. SCOTTO J, HADCHOUEL M, HERY C, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique : comparison with results for other viral markers. *Hepatology* 1983;3:279-84.
12. THIERS V, NAKAJIMA E, KREMSDORF D, et al. Transmission of hepatitis B from hepatitis B seronegative subjects. *Lancet* 1988;2:1273-6.
13. TIOLLAIS P, POURCEL C, DEJEAN A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985;317:489-95.
8. TRAN A, et al. Emergence of take-over by hepatitis B virus (VHB) with rearrangements in the PreS/S and PreC/C genes during chronic HBV infection. *J Virol* 1991;65:3566.
9. ZAJNER HL, CUYPERS HTM, REESINK HW, et al. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993;341:722-24.

