

La culture du virus de l'hépatite B in vitro

RÉFÉRENCES

1. Tiollais P, Dejean A, Buendia MA. Virus de l'hépatite B et hépatocarcinome. *médecine-science* 1990 ; 6 : 96-7.
2. Pourcel C. Souris transgéniques pour le virus de l'hépatite B. *médecine-science* 1989 ; 5 : 626-36.
3. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989 ; 59 : 1145-56.
4. Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B virus. *Ann Rev Biochem* 1987 ; 56 : 651-96.
5. Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JJ, Essex M. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 1986 ; 47 : 37-47.
6. Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 1005-9.
7. Chang C, Jeng KS, Hu CP, et al. Production of hepatitis B virus *in vitro* by transient expression of cloned HBV-DNA in a hepatoma cell line. *Embo J* 1987 ; 6 : 675-80.
8. Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsuba K. Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with cloned viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 444-8.
9. Yaginuma K, Shirakata Y, Kobayashi M, Koike K. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 2678-82.
10. Acs G, Sells MA, Purcell RH, et al. Hepatitis B virus produced by transfected HepG2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 4641-4.

TIRÉS A PART

P. Roingcard.

m/s n° 1, vol. 8, janvier 92

Malgré l'existence de vaccins efficaces, le contrôle de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) reste difficile à l'échelle mondiale. On estime que 5 % de la population mondiale souffre d'infection chronique par le VHB, lequel représente une cause majeure d'hépatite chronique évoluant vers la cirrhose et le cancer primitif du foie [1].

La grande quantité de virus circulant dans le sang de certains sujets infectés ainsi que la transmission intra-familiale, très fréquente en pays d'endémie, indiquent que le VHB est extrêmement infectieux. Malgré cela, le VHB n'a jamais pu être cultivé *in vitro* sur des lignées cellulaires habituellement utilisées en virologie médicale. Le tropisme exclusivement hépatique du virus et la difficulté de maintenir des hépatocytes humains différenciés en culture expliquent l'absence de système de propagation du VHB *in vitro*. Cette absence a retardé la compréhension des mécanismes de pathogénicité du VHB, ainsi que l'étude de la réplication virale et des interactions entre virus et cellule hôte. Pour contourner ce problème, au moins trois modèles alternatifs ont été développés.

Le premier est fondé sur l'existence de virus d'organisation génétique identique au VHB, infectant la marmotte américaine, différentes espèces d'échasseurs, de canards et d'échassiers. Ces virus, maintenant regroupés dans la famille des *hepadnaviridae*, ont grandement contribué à l'étude des mécanismes de réplication du VHB. La marmotte, infectée chroniquement par son hepadnavirus, constitue un modèle particulièrement intéressant pour l'étude moléculaire du cancer primitif du foie [1].

Les souris transgéniques pour le génome du VHB constituent le deuxième modèle, lequel a été large-

ment décrit dans ces colonnes [2]. Ces animaux transgéniques ont permis d'étudier la spécificité d'expression des gènes viraux dans certains organes, et le rôle régulateur d'hormones dans cette expression. Plus récemment, ce modèle a permis de proposer un mécanisme de survenue de l'hépatocarcinome au cours de l'infection chronique B : les animaux accumulant les protéines virales d'enveloppe dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes évoluent vers une cytolysse intense avec apparition de nodules de régénération, puis d'un hépatocarcinome [1-3].

Le troisième modèle repose sur l'introduction de l'ADN viral, par transfection ou micro-injection, dans des cellules maintenues en culture. Ces techniques ont permis d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression des gènes du VHB, la structure, l'assemblage et le transport des particules sub-virales [4]. La transfection de lignées continues d'hépatocarcinome ou d'hépatoblastome avec le génome complet du VHB puis le clonage de ces lignées transfectées ont permis d'isoler des clones producteurs de virus complets [5-9], lesquels sont infectieux chez le chimpanzé [10, 11]. Ces systèmes de culture du VHB confirment les notions acquises en clinique en montrant que la réplication virale n'est pas directement cytotoxique pour la cellule infectée. La morphologie et la distribution intracellulaire des particules virales complètes peuvent être examinées dans des clones de la lignée d'hépatoblastome HepG2 transfectée [12]. La maturation du VHB a lieu dans le réticulum endoplasmique (*figure 1*) et de larges vésicules cytoplasmiques. Une exocytose de ces vésicules semble constituer un mécanisme pour le transport extracellulaire des particules virales, ce qui peut expliquer l'absence de cytotoxicité directe au cours de la réplika-

tion [12]. La comparaison des différents clones de la lignée HepG2 après transfection avec le génome complet permet d'analyser les événements cellulaires liés à la réplication virale complète et ceux liés à une simple synthèse de protéines virales sans maturation de virions. Une réplication virale abortive peut ainsi conduire à l'accumulation de capsides virales dans le noyau cellulaire et, à un haut niveau, cette accumulation devient cytotoxique [13]. En outre, l'étude des cellules HepG2 transfectées montre que la réplication virale s'accompagne d'une plus grande expression des antigènes d'histocompatibilité, exprimés à la membrane hépatocytaire [14]. Cette expression accrue pourrait faciliter la reconnaissance des cellules infectées par les cellules T cytotoxiques et contribuer à l'inflammation et à la nécrose hépatocytaire observées *in vivo*. La propagation du VHB en culture apporte donc des informations complémentaires de celles obtenues avec le modèle des souris transgéniques dans la compréhension de la pathogénicité directe ou indirecte.

Les systèmes initiés par transfert de génomes complets dans des cellules en culture peuvent permettre, par ailleurs, de tester *in vitro* les caractéristiques de virus mutants : on a pu ainsi montrer que des VHB mutés dans la région pré-c et potentiellement impliqués dans des hépatites B sévères (*m/s n° 7, vol. 7, p. 742*) étaient capables de réplication complète [15]. Enfin, ces systèmes de culture du VHB *in vitro* présentent un intérêt majeur pour l'évaluation des agents antiviraux utilisés dans le traitement des hépatites chroniques B [16] ■

Philippe Roingeard

Département d'explorations cellulaires et génétiques.

Alain Goudeau

Laboratoire de virologie, URA Cnrs 1334, CHRU Bretonneau, 37044 Tours Cedex, France.



Figure 1. **Virus de l'hépatite B détecté en microscopie électronique dans des coupes ultrafines de cellules de la lignée d'hépatoblastome HepG2 transfectée.** La flèche indique cinq virions dans une structure cellulaire compatible avec le réticulum endoplasmique. La barre représente 100 nanomètres.

RÉFÉRENCES

11. Surcou C, Eichberg JW, Hubbard GB, Romet-Lemonne JL, Essex M. A molecularly cloned hepatitis B virus produced *in vitro* is infectious in a chimpanzee. *J Virol* 1988 ; 62 : 3064-7.
12. Roingeard P, Lu S, Surcou C, et al. Immunocytochemical and electron microscopic study of hepatitis B virus (HBV) antigen and complete particle production in HBV DNA transfected cells. *Hepatology* 1990 ; 11 : 277-85.
13. Roingeard P, Romet-Lemonne JL, Leturcq D, Goudeau A, Essex M. Hepatitis B virus core antigen (HBc Ag) accumulation in an HBV non-producer clone of HepG2 transfected cells is associated with cytopathic effect. *Virology* 1990 ; 179 : 113-20.
14. Zhou DX, Taraboulos A, Ou JH, Yen BTS. Activation of class I major histocompatibility complex gene expression by hepatitis B virus. *J Virol* 1990 ; 64 : 4025-8.
15. Tong S, Diot C, Gripon P, Vitiski L, Trépo C, Guguen-Guillouzo C. *In vitro* replication competence of a cloned hepatitis B virus variant with a nonsense mutation in the distal pre-C region. *Virology* 1991 ; 181 : 733-7.
16. Lampertico P, Malter JS, Gerber MA. Development and application of an *in vitro* model for screening anti-hepatitis B virus therapeutics. *Hepatology* 1991 ; 13 : 422-6.