

L Le bourgeonnement du virus de l'hépatite B

Du fait d'une capacité de bourgeonnement spontané de leurs protéines d'enveloppe, le virus de l'hépatite B (VHB) humain et les virus animaux apparentés (Hepadnavirus) présentent une particularité qui les distingue de tous les autres virus enveloppés, celle d'être accompagnés de particules d'enveloppe produites en excès. Ainsi, outre le virus complet de 42 nm de diamètre, sont excrétées de la cellule infectée des particules non infectieuses constituées de protéines d'enveloppe virales ancrées dans une bicouche lipidique empruntée à la cellule hôte. Ces particules prennent la forme de billes de 22 nm de diamètre ou de filaments de même diamètre mais de longueur variable (figure 1). Dans le plasma d'un patient infecté par le VHB, elles sont détectées en quantité bien supérieure au virus. Les billes représentent 98 % à 99 % des particules virales contre 1 % à 2 % pour les filaments et moins de 0,2 % pour les virus complets. L'objectif de cette mini-synthèse est de faire le point sur les mécanismes de morphogenèse de ces différentes particules virales et d'évoquer les conséquences d'une telle particularité.

Les trois protéines d'enveloppe du VHB

Elles sont codées par un même cadre ouvert de lecture contenant 3 codons *start* situés en phase (figure 2A). En amont de ce cadre de lecture se trouve un promoteur (PS1) contenant une boîte TATA qui déclenche la transcription d'un ARNm de 2,4 kb codant pour la plus grande des protéines d'enveloppe, L (large). Un

second promoteur (PS2) sans boîte TATA, est localisé au sein du cadre de lecture, et permet la transcription de deux ARNm de 2,1 kb présentant des extrémités 5' légèrement différentes.

Le plus long de ces transcrits contient un codon *start* utilisé pour l'expression de la protéine M (*middle*) ; le plus court, dépourvu de ce codon *start*, permet, à partir d'un codon *start* situé

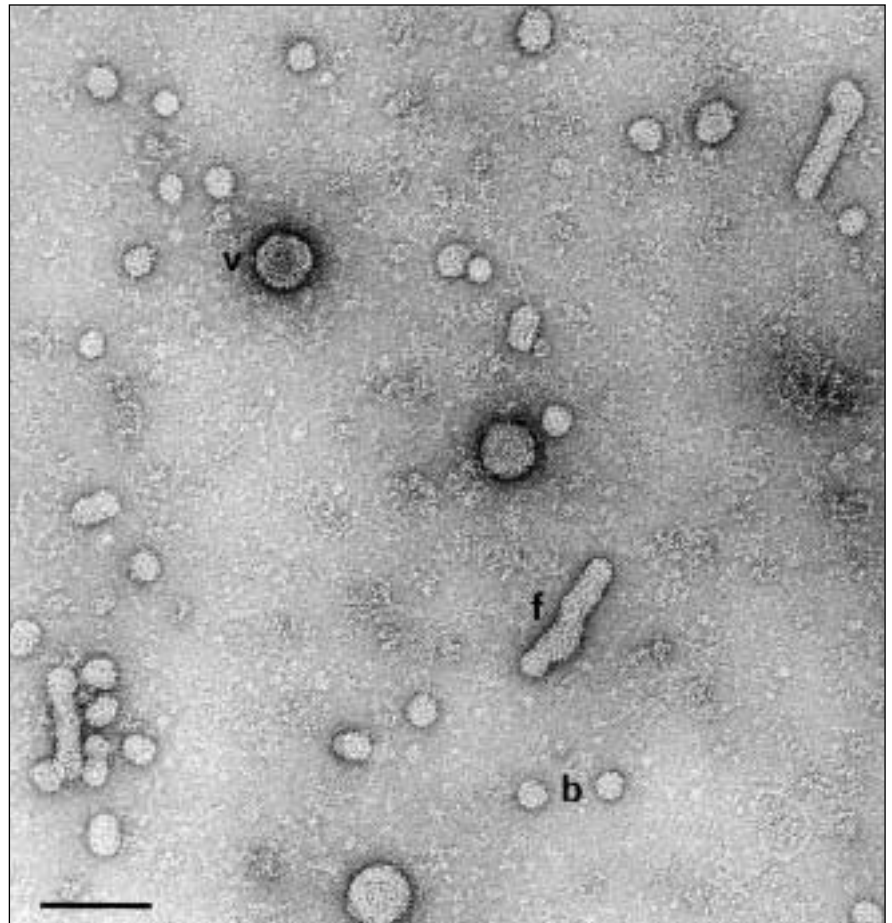


Figure 1. **Les trois types de particules virales présentes dans le plasma d'un sujet infecté par le VHB, en microscopie électronique à transmission.** Le virion complet (v) est constitué d'une enveloppe entourant une capsidie qui contient l'ADN viral et l'ADN polymérase ; les billes (b) et les filaments (f) représentent des particules d'enveloppe produites en excès, non infectieuses (barre = 100 nm).

55 triplets en aval, la traduction de la protéine S (*small*). Du fait de la faible efficacité de son codon *start* situé en 5', le transcrit le plus long peut également engendrer la traduction de la protéine S. La région codant pour ces protéines d'enveloppe est ainsi divisée en trois domaines pré-S1, pré-S2 et S. La protéine L contient les trois domaines pré-S1, pré-S2 et S. La protéine M contient les domaines pré-S2 et S tandis que la protéine S ne contient que le domaine S. Ciblés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE), ces trois protéines ont une topologie transmembranaire complexe. La protéine S présente au

moins deux domaines transmembranaires, son domaine amino-terminal étant exposé dans la lumière du RE. Très hydrophobe, son extrémité carboxy-terminale est probablement fortement ancrée dans la membrane. La protéine M présente une topologie similaire, le domaine amino-terminal additionnel pré-S2 étant exposé dans la lumière du RE. Après bourgeonnement, ce domaine pré-S2 se retrouve exposé en surface des particules virales et des particules d'enveloppe produites en excès. La topologie transmembranaire de la protéine L est la plus étonnante. A l'inverse de la protéine M, les domaines pré-S de la

protéine L sont exposés sur la face cytosolique de la membrane du RE. Cependant, dans le virus, la moitié des protéines L exposent leurs domaines pré-S en surface du virus (*figure 2B*) [1]. Le mécanisme responsable d'une telle réorganisation de la topologie transmembranaire de la protéine L est inconnu et n'a jamais été observé pour d'autres modèles viraux. Les trois protéines sont présentes en proportions variables dans les trois types de particules virales (*figure 2C*). La protéine S est majoritaire partout; la protéine M représente 20 % des protéines d'enveloppe dans toutes les particules; la protéine L n'est présente qu'à l'état de traces dans les particules sphériques d'enveloppe produites en excès, mais représente au moins 30 % des protéines d'enveloppe dans les filaments d'enveloppe et les virions.

Morphogenèse des virions et des particules d'enveloppe sphériques ou filamenteuses produites en excès

L'accumulation des protéines d'enveloppe sur la membrane d'un compartiment pré-golgien puis leur dimérisation et multimérisation (sans préférence apparente d'association entre les trois protéines) conduit au bourgeonnement d'une portion de membrane, par un mécanisme encore inconnu. En conséquence, les particules virales et les particules d'enveloppe produites en excès bourgeonnent dans la lumière de ce compartiment pré-golgien (*figure 3A*) [2]. En présence d'une faible concentration en protéine L, ce bourgeonnement produit des particules d'enveloppe en forme de billes qui seront sécrétées de la cellule infectée par voie constitutive (*figure 3B*). L'assemblage du virion se fait, quant à lui, dans des zones membranaires enrichies en protéine L, grâce à une interaction protéine/protéine spécifique entre la nucléocapside et un court domaine chevauchant la transition entre les domaines pré-S1 et pré-S2 dans la protéine L [3, 4]. Ce mécanisme offre au virus la garantie de s'entourer d'une enveloppe enrichie en protéine L, indispensable à son caractère infectieux (*figure 3A*). Ainsi,

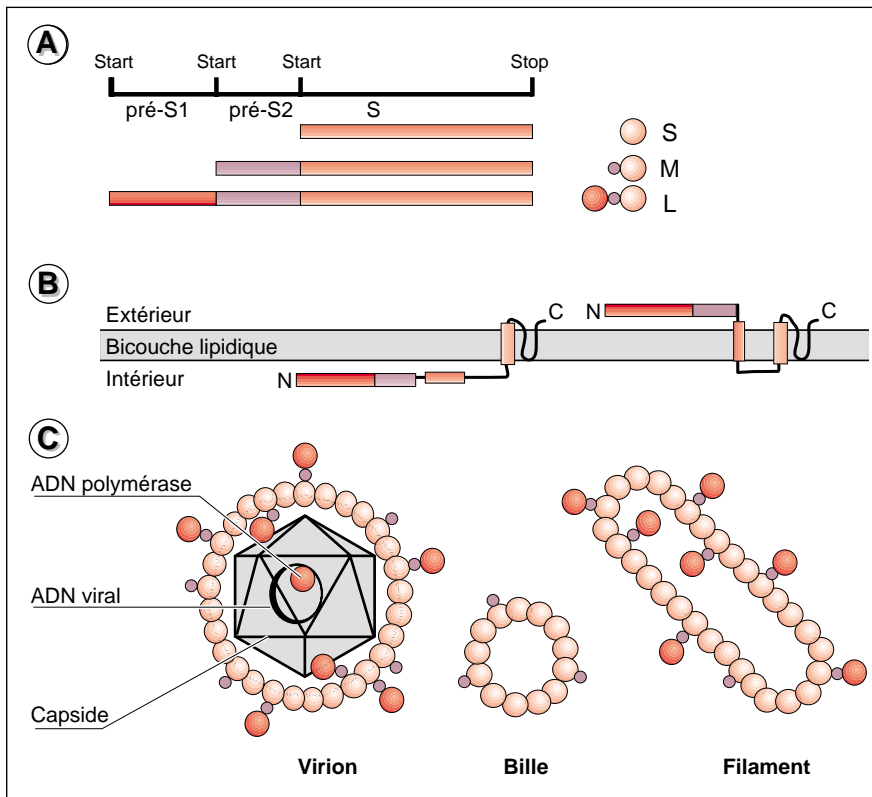


Figure 2. Les trois protéines d'enveloppe du VHB et leur proportion dans les trois types de particules virales. A. Le cadre ouvert de lecture des protéines d'enveloppe sur le génome viral contient trois codons start situés en phase, donnant naissance à trois protéines S, M et L présentant des domaines communs. B. Dans les particules virales ou les particules d'enveloppe produites en excès, la protéine L présente deux topologies transmembranaires distinctes: l'une lui permet d'exposer ses domaines pré-S1 et pré-S2 vers l'intérieur de la particule, tandis que l'autre lui permet au contraire de les exposer en surface de ces mêmes particules. C. Dans les trois types de particules virales, la protéine S est majoritaire et la protéine M est représentée uniformément; en revanche, les virions et les filaments d'enveloppe contiennent une proportion importante de protéine L, alors que les billes en sont pratiquement dépourvues.

après le bourgeonnement, la moitié des protéines L incorporées dans le virion modifient leur topologie transmembranaire pour exposer leurs domaines pré-S en surface du virion. Une fois le virus sécrété, le domaine pré-S1 de la protéine L en surface du virus assurera l'étape d'adsorption à la surface d'un hépatocyte.

La morphogenèse des filaments d'enveloppe requiert une membrane du compartiment pré-golgien enrichie en protéine L mais également une dilatation importante de ce compartiment, vraisemblablement due à une accumulation maximale des protéines d'enveloppe du VHB [5]. Dans ces conditions, un bourgeonnement en rouleau d'une portion de membrane plus ou moins longue va engendrer un filament dans la lumière du compartiment (figure 3A et figure 4). Les filaments les plus longs (certains peuvent atteindre une

longueur de 800 nm) restent piégés au sein du compartiment pré-golgien tandis que les plus courts sont sécrétés par voie constitutive comme les virions et les particules sphériques d'enveloppe produites en excès (figure 3B). Un tel blocage mécanique de la sécrétion pourrait expliquer la propriété de rétention intracellulaire des protéines d'enveloppe exercée par la protéine L [5]. Cependant, d'autres facteurs tels que l'interaction de la protéine L avec des facteurs cytosoliques avant le bourgeonnement ou avec des protéines chaperon dans les compartiments cellulaires ont été proposés [6, 7].

Rôle des particules d'enveloppe produites en excès dans le cycle infectieux

L'avantage sélectif que présenteraient pour le virus ces particules

d'enveloppe produites en excès reste spéculatif. Ces particules non-infectieuses, présentes en quantité bien supérieure au virion, pourraient constituer un leurre pour les anticorps destinés à neutraliser le virus. A l'inverse, on pourrait envisager une éventuelle compétition entre le virus et ses particules d'enveloppe produites en excès pour les récepteurs présents à la surface des hépatocytes. Le modèle de l'hepadnavirus du canard a cependant montré de manière tout à fait étonnante que l'adsorption de particules d'enveloppe produites en excès à la surface des hépatocytes pouvait au contraire augmenter la réplication virale [8]. Le mécanisme d'un tel phénomène n'est pas encore établi mais pourrait être en relation avec une activation de signaux intracellulaires *via* un récepteur hépatocytaire et/ou une transactivation directe ou indirecte de la transcription du génome viral exercée par les protéines d'enveloppe. Cette dernière hypothèse est renforcée par la mise en évidence récente des propriétés transactivatrices des domaines pré-S du VHB [9, 10]. Il reste toutefois à démontrer que ces propriétés transactivatrices existent après internalisation des protéines.

Conséquences physiopathologiques

L'agression hépatique au cours d'une infection aiguë ou chronique par le VHB est principalement la conséquence de la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte infecté. Cependant, chez des sujets immunodéprimés tels que les sujets transplantés ou les sujets co-infectés par le virus de l'immunodéficience humaine, le déficit immunitaire favorise la survie des cellules infectées et conduit à l'accumulation intracellulaire des protéines d'enveloppe du VHB. Une telle accumulation est associée à un effet cytotoxique direct conduisant à un syndrome appelé hépatite cholestatique et fibrosante [11]. Ce syndrome est caractérisé par une ballonnisation des hépatocytes présentant à l'examen anatomopathologique des inclusions cytoplasmiques en verre dépoli. Cette ballonnisation des cellules hépatiques est

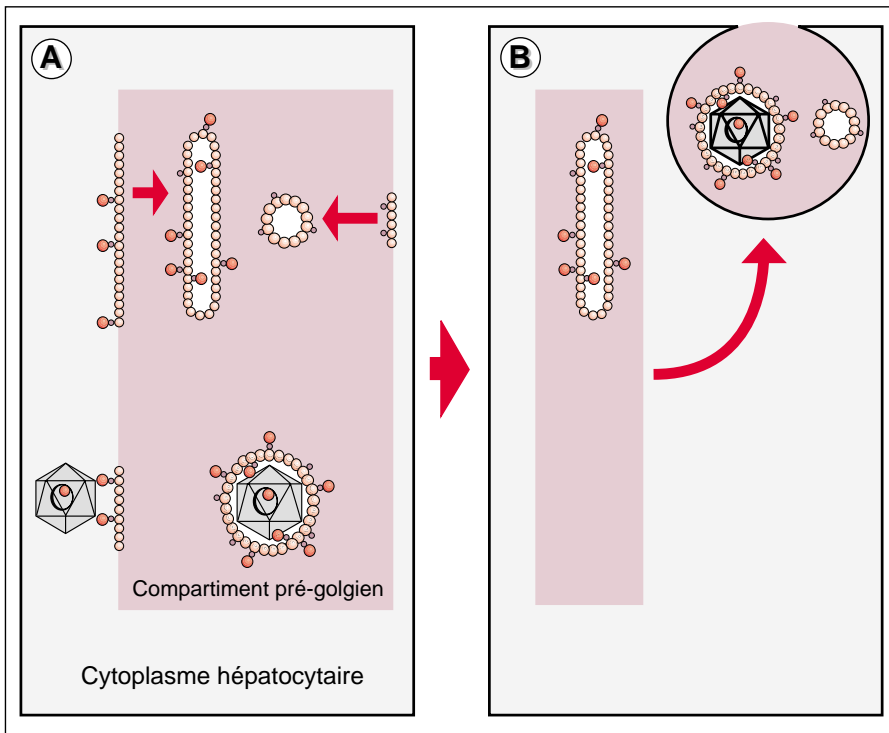


Figure 3. **Morphogenèse et sécrétion des particules virales dans l'hépatocyte infecté.** **A.** Le bourgeonnement spontané des protéines d'enveloppe s'effectue dans un compartiment pré-golgien. La particule virale est formée par un recrutement spécifique de la nucléocapside par la protéine L. La concentration élevée de protéine L sur une longue portion de membrane induit la formation d'un filament. **B.** Les particules virales sont sécrétées par voie constitutive mais les filaments d'enveloppe les plus longs restent piégés dans les compartiments intracellulaires.

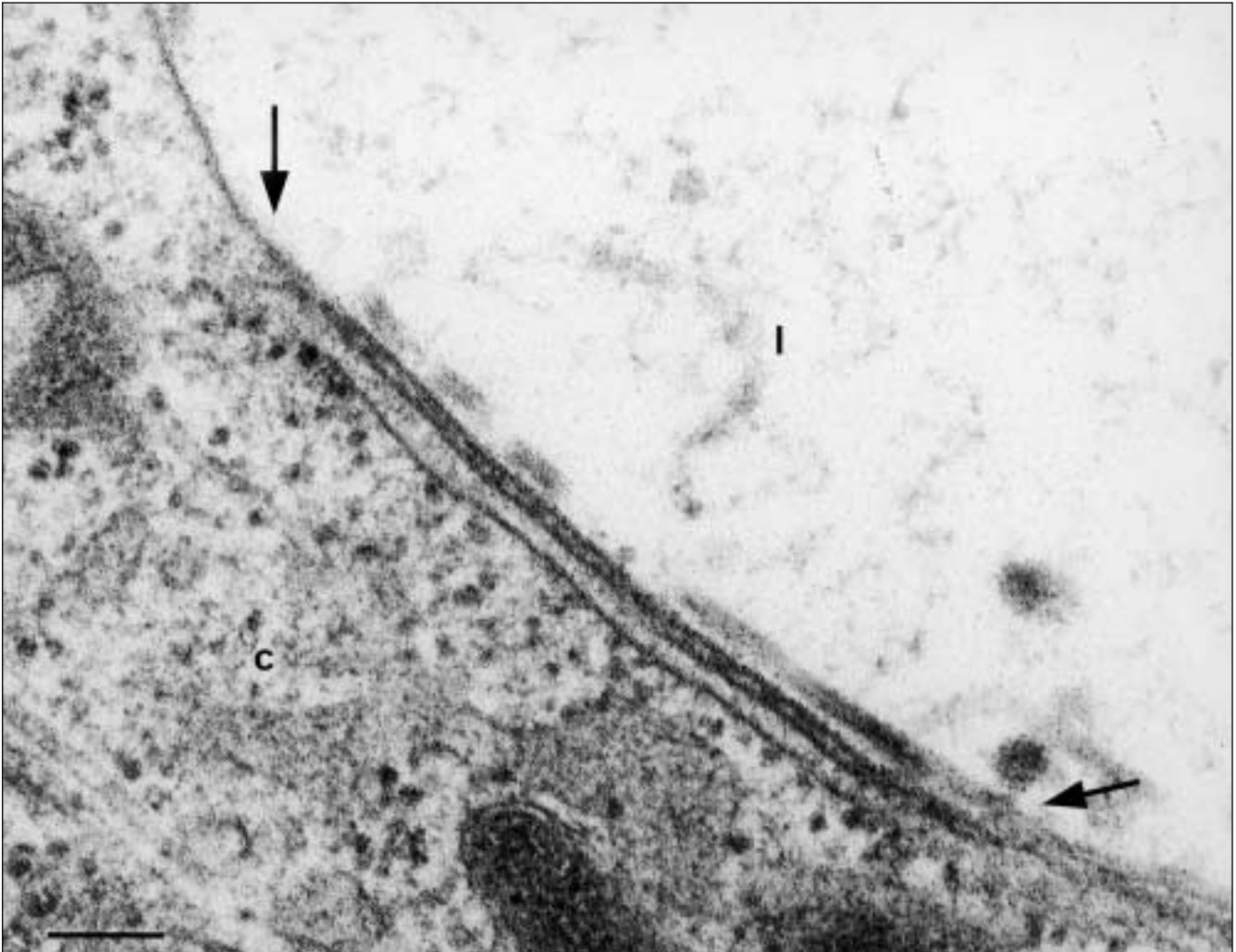


Figure 4. **Morphogenèse d'un filament d'enveloppe en microscopie électronique à transmission.** La formation d'un tel filament se fait par un bourgeonnement en rouleau d'une grande portion de membrane (comprise entre les deux flèches) enrichie en protéine L. c: cytoplasme; l: lumière du compartiment prégolgien (barre = 100 nm).

due à l'extrême dilatation des compartiments prégolgiens contenant les protéines d'enveloppe du VHB et à l'accumulation des filaments d'enveloppe dans ces compartiments [5]. Ce phénomène particulièrement bien étudié dans le contexte d'une immunosuppression contribue vraisemblablement d'une manière plus générale à l'évolution d'une hépatite chronique B vers la cirrhose [12]. Par ailleurs, un modèle de souris transgéniques a montré que l'accumulation des filaments d'enveloppe cause une nécrose inductrice d'une régénération hépatocytaire, laquelle constitue un terrain favorable au

développement d'un hépatocarcinome [13].

Une autre conséquence de la capacité de bourgeonnement spontané des protéines d'enveloppe est certainement d'avoir favorisé l'émergence d'un pseudo-virus satellite du VHB, l'agent de l'hépatite delta [14]. Ce pseudo-virus qui aurait pour origine une recombinaison entre un viroïde et un ARN messager cellulaire codant pour un facteur de transcription [15] est autonome pour sa répllication ne peut pas être excrété d'une cellule infectée en l'absence des protéines d'enveloppe du VHB [16]. Grâce à une interaction protéi-

ne/protéine entre les protéines d'enveloppe du VHB et l'unique protéine codée par cet agent delta (antigène delta), l'ARN de ce pseudo-virus peut s'entourer de l'enveloppe du VHB et être sécrété hors de la cellule infectée [17].

Perspectives en biotechnologie

La présence de particules d'enveloppe produites en excès accompagnant le VHB fut mise à profit il y a plus de 20 ans pour préparer des vaccins contenant ces particules non infectieuses purifiées à partir de plasmas humains [18]. Par la suite, les

techniques de biologie moléculaire ont permis d'obtenir des particules vaccinales par l'expression de la protéine S, seule ou accompagnée de la protéine M, en cellule de mammifère ou dans la levure. Ces particules ont également été utilisées comme molécules porteuses d'épitopes exogènes (polyovirus, virus de l'immunodéficience humaine) pour une présentation optimale de ces déterminants antigéniques au système immunitaire [19]. Enfin, une perspective intéressante est l'utilisation de ces particules comme vecteurs de gènes, lesquelles permettraient un ciblage tout à fait spécifique de la cellule hépatique [20] ■

RÉFÉRENCES

1. Bruss V, Lu X, Thomssen R, Gerlich WH. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* 1994; 13: 2273-9.
2. Huovila AP, Eder AM, Fuller SD. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 1992; 118: 1305-20.
3. Poisson F, Severac A, Hourieux C, Goudeau A, Roingeard P. Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* 1997; 228: 115-20.
4. Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol* 1998; 72: 5573-8.
5. Roingeard P, Sureau C. Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2 transfected cells with special emphasis on subviral filaments morphogenesis. *Hepatology* 1998; 28: 1128-33.
6. Gallina A, Gazina E, Milanese G. A C-terminal preS1 sequence is sufficient to retain hepatitis B virus L protein in 293 cells. *Virology* 1995; 213: 57-69.
7. Xu Z, Bruss V, Yen B. Formation of intracellular particles by hepatitis B virus large surface protein. *J Virol* 1997; 71: 5487-94.
8. Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 1998; 72: 1462-8.
9. Kim HS, Ryu CJ, Hong HJ. Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. *J Gen Virol* 1997; 78: 1083-6.
10. Caselman WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M. The hepatitis B virus MHBs¹⁶⁷ protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 1997; 78: 1487-95.
11. Lau JYN, Bain VG, Davies SE, O'Grady JG, Alberti A, Alexander GJM, Williams R. High level expression of hepatitis B viral antigens in fibrosing cholestatic hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 102: 956-62.
12. Naoumaov NV, Portmann BC, Tedder RS, Ferns B, Eddleston ALWF, Alexander GJM, Williams R. Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissues. *Gastroenterology* 1990; 99: 1248-53.
13. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Palmeter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Cell* 1989; 59: 1145-56.
14. Poisson F, Roingeard P, Goudeau A. Le virus de l'hépatite delta: un mode de répllication bien singulier. *Med Sci* 1995; 11: 1379-87.
15. Brazas R, Ganem D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science* 1996; 274: 90-4.
16. Chen PJ, Chen DS. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1998; 338: 1312.
17. Hourieux C, Sureau C, Poisson F, Brand D, Goudeau A, Roingeard P. Interaction between hepatitis delta virus-encoded proteins and hepatitis B virus envelope proteins domains. *J Gen Virol* 1998; 79: 1115-9.
18. Goudeau A. La vaccination contre l'hépatite B: vingt ans d'expérience clinique. *Virologie* 1998; 2: 16-29.
19. Schlienger S, Mancini M, Riviere Y, Dormont D, Tiollais P, Michel M. human immunodeficiency virus type 1 major neutralizing determinant exposed on hepatitis B surface antigen particles is highly immunogenic in primates. *J Virol* 1992; 66: 2570-6.
20. Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, Wunderlich G. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* 1996; 39: 23-31.

Philippe Roingeard

Maître de conférences des universités, praticien hospitalier.

Christophe Hourieux

*Doctorant, boursier de l'ARC.
Laboratoire de Biologie cellulaire et Laboratoire de virologie, EA2639, Faculté de médecine de Tours, 2 bis, boulevard Tonnelé, 37032 Tours Cedex, France.*

TIRÉS À PART

P. Roingeard.