

Cours : Biochimie N°11
Professeur Tiollais
Le 05/11/2007 à 10h30
Ronéotypeur : Julien GANEM

Le virus de l'Hépatite B

Cette ronéo sera en ligne sur <http://clement.ad.free.fr/fac/fac.html>.
Merci à Clément !

Plan du cours

I) L'Hépatite B

II) Les particules virales

III) Le génome viral

IV) Transcription et Réplication

F- Transcription

G- Réplication

V) L'hépatocarcinome

VI) Le vaccin recombinant

M. Tiollais donne la possibilité aux étudiants de le contacter à son bureau à l'Institut Pasteur pour les éventuelles questions qu'ils auraient à poser ainsi qu'à les recevoir.

Pierre Tiollais : 01.45.68.88.20.

I) L'Hépatite B

La maladie de l'Hépatite B se transmet de façons différentes :

- Il peut y avoir, très souvent, transmission de la mère à l'enfant au moment de l'accouchement si la mère est porteur chronique du virus. C'est un mode de transmission très fréquent.
- Transmission par voie sexuelle (un peu comme le sida)
- Piqûre accidentelle : dans la mesure où le virus est dans le sang en quantité importante.

Par conséquent, il y a donc des professions à risque, parce qu'il y a manipulation de sang, comme le personnel médical et surtout les infirmières.

Dans 80% des cas, la maladie est inapparente, il n'y a aucun trouble fonctionnel ; la personne est porteur du virus, mais il n'y a pas d'incidents médicaux.

La forme aigue représente environ 20% des cas.

Très rarement (moins de 1%), on a affaire à une hépatite fulminante, mortelle très rapidement.

Évolution : il faut distinguer l'adulte de l'enfant !

Chez l'adulte, il y a 80% de guérisons, totales et sans complications.

Chez l'enfant, c'est quasiment l'inverse puisque dans 80% on a un passage à la chronicité avec des complications, probablement à cause du système immunitaire qui n'est pas mature.

Complications : c'est l'Hépatite chronique qui peut donner avec un délai très long (jusqu'à plusieurs dizaines d'années) une cirrhose ou un cancer du foie (d'où l'importance des mesures préventives pour le personnel à risque).

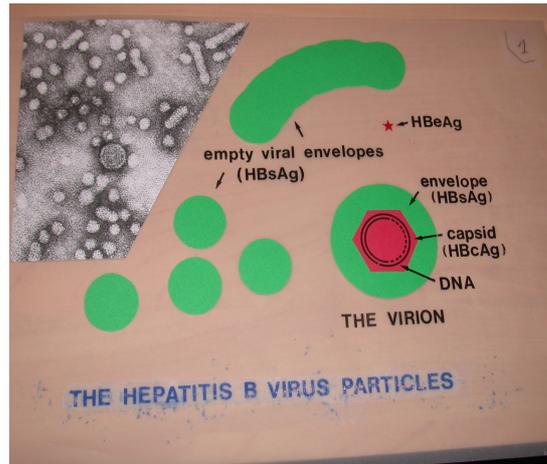
D'un point de vue géographique, il y a des régions plus ou moins touchées. En Extrême-Orient (comme en Chine), l'Hépatite B est très fréquente beaucoup plus qu'en France : 10% de la population est porteur chronique du virus alors qu'en France c'est moins de 0,5%.

II) Les particules virales

Elles sont très importantes, très nombreuses dans le sérum, on les voit en microscopie électronique.

Il y a deux catégories de particules virales :

- Le virion : le virus infectieux, en quantité très faible
- Les enveloppes virales vides présentes en très large excès qui sont des petites particules très nombreuses. Elles ne sont pas infectieuses car elle ne comportent pas de génome.



Structure des particules et protéines impliquées :

Le virion : à l'intérieur, on retrouve la capside qui est entourée de l'enveloppe du virus. Cette enveloppe virale est constituée :

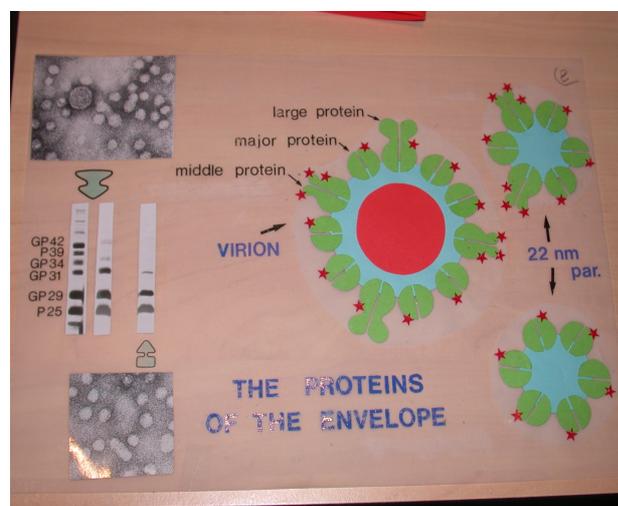
- D'une bicouche lipidique au niveau de la face interne de l'enveloppe virale
- De protéines au niveau de la face externe de l'enveloppe virale

Il y a 3 protéines essentielles:

- La grande protéine
- La protéine moyenne
- La petite protéine ou protéine majeure car elle est en très large excès par rapport aux deux autres.

Ces trois protéines ont des structures très communes, on peut considérer que ce sont pratiquement les mêmes protéines.

Les particules virales vides sont aussi appelées les particules de 22 nm. Elles ne contiennent qu'une seule protéine : la protéine majeure.



III) Le génome viral

C'est certainement le plus petit génome des virus de l'homme.
Il est formé d'ADN, c'est un génome circulaire qui fait 3200 nucléotides.
Il est partiellement bi-caténaire : on distingue un brin long et un brin court.

Pour l'étudier, on va le cloner (application médicale de la technologie du génie génétique).

Le clonage a été relativement facile, dans la mesure où cette molécule d'ADN bi caténaire possédait un seul site EcoRI.

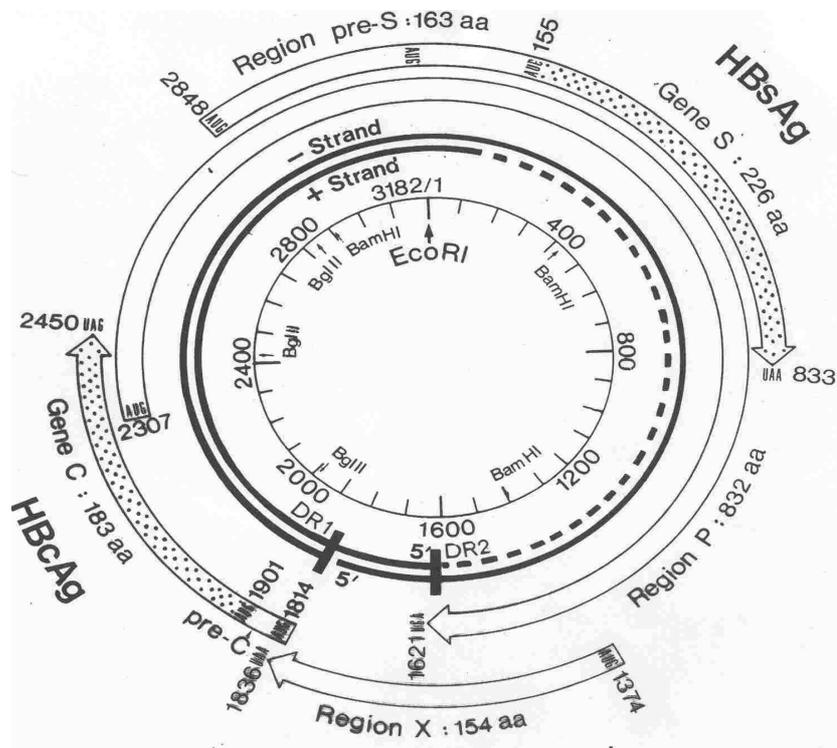
On purifie le virion (difficile car il y a beaucoup de particules), on extrait l'ADN et on le coupe par EcoRI.

Après coupure par EcoRI, on va amplifier considérablement le génome pour en faire la séquence (3200 nucléotides, c'est une séquence raisonnable !) et comprendre comment il s'organise, comment sont ses gènes.

Pour faire le clonage, on doit réparer la portion mono-caténaire de telle façon à avoir de l'ADN bi-caténaire.

Une fois le clonage fait, on fait la séquence du génome.

Elle permet de déterminer les phases de lecture ouvertes : ce sont les gènes (qui comportent un codon initiateur et un codon de terminaison avec une phase ouverte pour fabriquer une protéine).



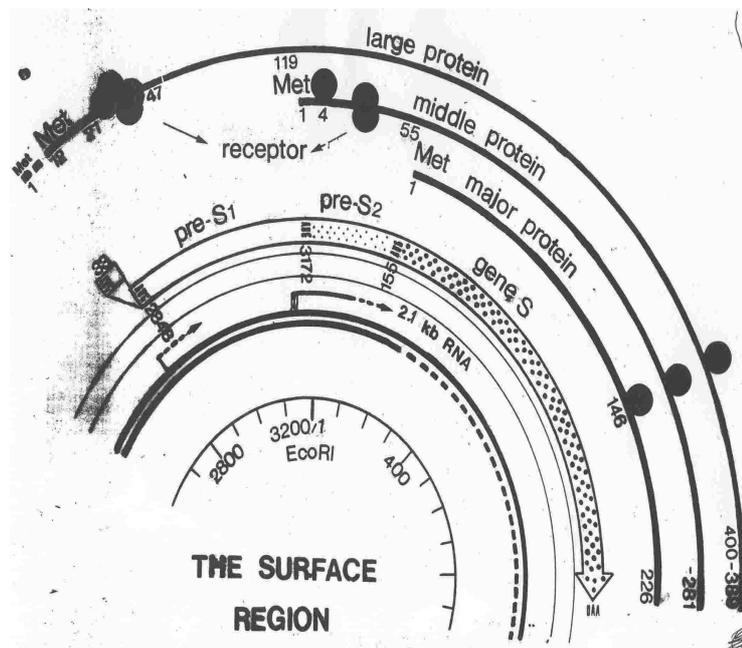
Le génome est très petit, avec seulement 4 gènes :

- **Gène S**
- **Gène C** : plus petit que le gène S
- **Gène P** : un très grand gène qui correspond au trois quarts du génome
- **Gène X** : on n'en connaissait pas bien la fonction lorsqu'on l'a découvert

Remarque : Le gène *S* « chevauche » le gène *P* (ce qui peut paraître étrange), mais il ne faut pas oublier qu'ils sont dans deux phases de lecture différentes. La séquence de la protéine issue du gène *S* ne sera pas la même que celle de la protéine issue de *P* donc on aura des protéines très différentes.

- Le gène *S*, divisé en 3 parties, code pour les protéines de Surface : la protéine majeure, la protéine moyenne et la grande protéine.
- Le gène *C* code pour la protéine de la Capside
- Le gène *P* code pour l'ADN Polymérase
- Le gène *X*, on n'en connaissait pas la fonction possible d'où le choix de la lettre *X*.

Le gène *S* code pour les 3 protéines de l'enveloppe du virus.



La séquence codant pour la grande protéine commence au début du gène *S* jusqu'à la fin du gène.

Celle de la protéine moyenne commence par un autre codon initiateur, mais se termine de la même manière que la grande protéine. On a donc une grande ressemblance avec la grande protéine.

La séquence codant pour la petite protéine commence à un autre codon initiateur et sa séquence se retrouve dans les autres protéines (car on est dans la même phase de lecture ouverte).

Il existe également des sites de glycosylation.

Il y a deux ARNm majeurs :

- Le 2,1 kb (kilobases)
- Le 3,5 kb : plus long que le génome qui ne fait que 3,2 kb

Les 2 messagers se terminent au même endroit, ils ont le même codon de terminaison.

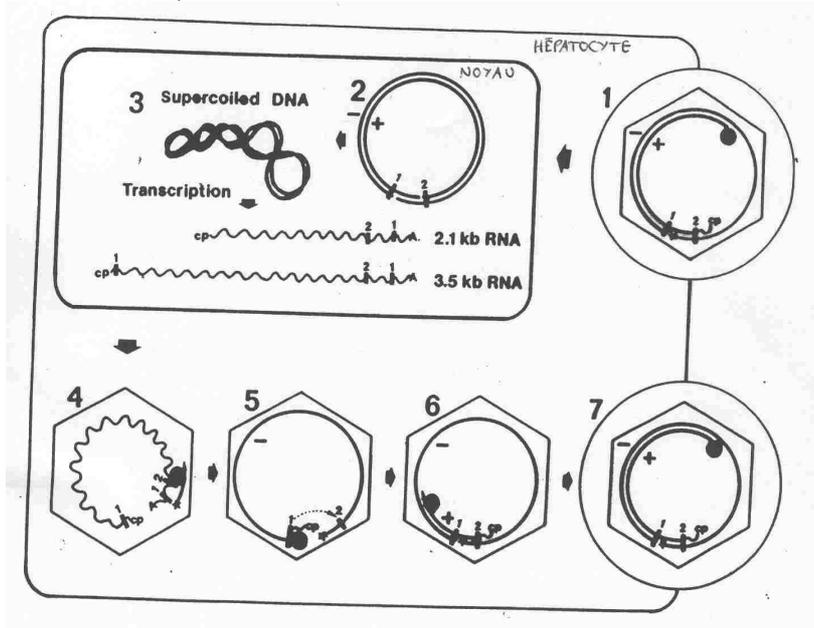
Ils codent pour les 4 protéines vues ci-dessus.

Le 2,1 kb code pour le gène S, mais pas la région pré-S1 : code pour les moyenne et grande protéines, et le gène X.

Le 3,5 kb code pour le gène P, le gène C et pour l'extrémité de la région S correspondant à la grande protéine (région pré-S1).

B) La réplication

La réplication a un fait original qui finalement fait que le virus de l'hépatite B peut être un peu rapproché des rétrovirus (même si c'est un virus à ADN). Il y a en effet une phase de transcription inverse : synthèse d'ADN à partir d'ARN (particularité des rétrovirus).



En haut à droite, le virion pénètre dans l'hépatocyte, l'enveloppe est détruite et le génome viral pénètre dans le noyau de la cellule.

Dans le noyau, il y a fermeture des coupures préalablement existantes et formation d'un ADN bi caténaire circulaire : c'est l'ADN super enroulé.

À partir du génome super enroulé s'effectue la transcription.

On ne retiendra que le 3,5 kb RNA. Cette molécule d'ARN est encapsidée puis à partir de ce messager, il y a synthèse d'une molécule d'ADN.

Au bout d'un certain temps, on a synthèse complète d'un brin du génome et la molécule d'ARN est hydrolysée.

On a donc une molécule d'ADN monocaténaire qui a la taille du génome.

Puis il y a synthèse de l'autre brin d'ADN (à partir d'ADN). Le brin court est plus ou moins complet (variable d'un virus à l'autre). La particule virale se fabrique et sort de la cellule avant que le brin court ne soit terminé.

V) L'hépatocarcinome ou cancer du foie

Dans un premier temps, il y a eu une étude clinique qu'on appelle une étude d'épidémiologie à Taipei au Taiwan.

Les chercheurs ont étudié des sujets HBs (Hépatite B surface) positifs au nombre de 3464.

En parallèle, il y a eu une étude de sujets HBs négatifs au nombre de 19253.

Pour les HBs positifs, 113 cancers du foie sont décelés.

Pour les HBs négatifs, seuls 3 cancers du foie sont détectés.

Le risque est de 208, c'est-à-dire qu'être HBs positif prédispose 208 fois plus à un cancer du foie par rapport aux sujets sains (HBs négatif).

L'épidémiologie n'explique pas les mécanismes du lien entre le virus de l'Hépatite B et l'hépatocarcinome, mais apporte une preuve de l'existence de ce lien.

Il faut ensuite étudier en biochimie-biologie, quel peut être le rôle du virus dans l'induction du cancer.

Il y a chez les malades atteints du cancer du foie, il y a intégration du génome viral dans le génome cellulaire. Cela a pu être mis en évidence grâce à un Southern blot qui a détecté le génome viral (apparition de bandes) dans le génome de la cellule.

Intégration du génome viral et cancer : le mécanisme est multiple mais dans certains cas, il y a intégration du génome viral dans un oncogène : C-Myc.

L'intégration du génome viral dans le promoteur du gène C-Myc active la transcription de cet oncogène, ce qui entraîne un cancer.

Les premières études ont été effectuées chez l'animal ; la marmotte étant celui utilisé le plus souvent car il existe un virus de l'Hépatite de la marmotte, différent de celui de l'homme. Le mécanisme a été montré chez la marmotte puis confirmé chez l'homme.

Mais, dans certains cas, on ne retrouve pas le génome viral dans C-Myc.

Il existe de multiples mécanismes dans la transformation maligne des hépatocytes.

VI) Le vaccin recombinant

Le virus de l'Hépatite B ne se cultive pratiquement pas. Or, certains vaccins sont effectués à partir de virus atténués en culture, mais ce n'est pas possible pour le virus de l'Hépatite B (puisque'il se cultive très mal).

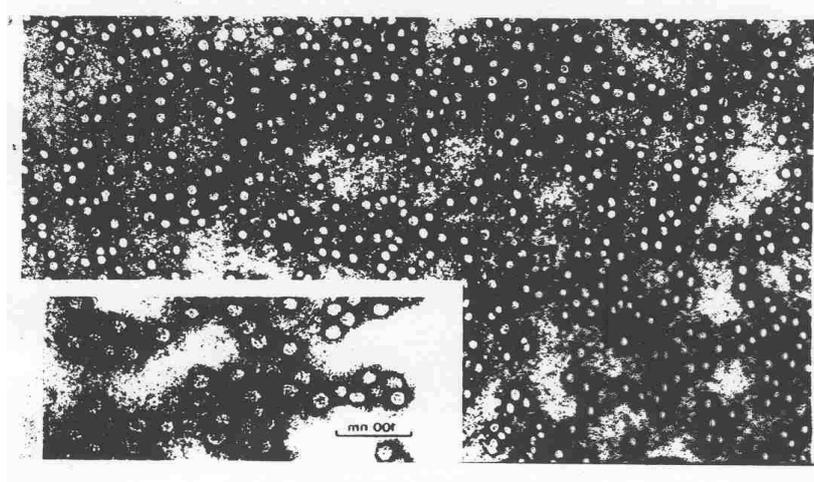
Dans un premier temps, des chercheurs ont pensé utiliser les petites particules non-infectieuses qui portent la même structure extérieure que le virion : en effet, les anticorps sont dirigés contre les protéines de surface.

Il y a élaboration d'un vaccin sérique par purification des particules virales non-infectieuses. Ce vaccin a été utilisé pendant quelques années.

Cependant, il faut collecter une grande quantité de sérum et purifier les petites particules du sérum avec le risque qu'il reste des virions (+ problèmes avec le SIDA dans le sérum...).

On a fait alors appel à la technologie du génie génétique : c'est un travail fait en 2 parties, la première partie étant un échec.

On introduit le gène S dans une bactérie en pensant que la bactérie fabriquerait le vaccin. Il y a bien synthèse des protéines mais pas de particules.
Pour avoir des particules, il faut prendre des cellules animales. Elles produisent des particules, comme le virus lorsqu'il se multiplie dans le foie.
On effectue le clonage du gène S dans les cellules animales (cellules de hamster) avec amplification du nombre de copies.
Cette amplification induit une augmentation de la production de petites particules. Les cellules animales ont l'avantage de sécréter les particules dans le milieu de culture.
Il est d'ailleurs plus facile de purifier les petites particules dans le milieu de culture que dans le sérum.



Les petites particules ci-dessus sont absolument identiques en taille et en structure à celles que l'on trouve dans le sérum.
Les particules de 22nm qui sont en large excès dans le sérum se retrouvent également ici en très grande quantité, mais sans particules infectieuses.
Aujourd'hui, c'est ce vaccin recombinant qui est largement utilisé pour le personnel à risque.

Il y a eu une polémique en France : « le vaccin de l'Hépatite B risque d'entraîner des troubles neurologiques ».
À cette époque, la moitié de la population française est vaccinée.
Une étude épidémiologique montre qu'il n'y a pas plus de complications neurologiques (comme la sclérose en plaques) chez les vaccinés que chez les non-vaccinés.