

**COMPTES RENDUS
DES SÉANCES
DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES**

TOME DEUX-CENT QUATRE-VINGT-NEUVIÈME

SÉRIE D : SCIENCES NATURELLES

DEUXIÈME PARTIE : OCTOBRE-DÉCEMBRE 1979

**PARIS
GAUTHIER-VILLARS IMPRIMEUR
1979**

VIROLOGIE. — *Identification d'un virus semblable au virus de l'hépatite B dans les hépatites NON-A NON-B.* Note (*) de **Olivier Hantz, Ludmila Vitvitski, Christian Pichoud et Christian Trepo**, présentée par Michel Jouvét.

Des particules morphologiquement identiques à celles du virus de l'hépatite B, certaines possédant une activité ADN polymérase ont été identifiées dans les sérums d'hépatite virale ni A ni B (ou hépatite C), positifs pour l'antigène HC. Ces particules dépourvues d'antigène HBs sont spécifiquement associées à l'Ag HC qui n'est cependant pas exprimé à leur surface. La parenté exacte du virus de l'hépatite C ainsi identifié pour la première fois avec le virus de l'hépatite B est à l'étude.

Hepatitis B virus-like particles (including DANE particles) with DNA polymerase activity but negative for HBs Ag have been identified in NON-A, NON-B hepatitis sera positive for HC Ag. Although specifically associated with the particles, HC Ag is not a surface antigen of the hepatitis C virus identified here for the first time. The relationship of this agent with HBV seems obvious, and deserves further study.

INTRODUCTION. — Deux virus responsables de l'hépatite virale humaine sont identifiés, le virus A (VHA) et le virus B (VHB). L'existence d'un troisième groupe d'hépatites désignées ni A ni B (NANB) a été démontrée par les études post-transfusionnelles et les expériences d'inoculation chez le Chimpanzé ([1], [2]). Les données cliniques et épidémiologiques actuelles suggèrent que le(s) virus responsable(s) se rapproche(nt) plus du VHB que du VHA. Tous les efforts pour le(s) identifier ont jusqu'ici échoué. Récemment Shirashi [3] et Prince [4] ont souligné l'existence d'un système antigène-anticorps désigné HC, associé aux hépatites NANB. Nous venons de confirmer l'existence d'un tel antigène sérique détectable par immunodiffusion et d'en démontrer, grâce à l'immunofluorescence, la localisation dans le noyau des hépatocytes infectés [5]. Nous rapportons ici la mise en évidence dans les sérums contenant cet antigène de particules d'allure virale, morphologiquement identiques au VHB et possédant une activité ADN polymérase.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — 1° Le diagnostic d'hépatite aiguë ou chronique fut établi dans tous les cas selon les critères classiques [6]. L'hépatite VHA a été affirmée sérologiquement par la mise en évidence d'anticorps anti-HA de classe IgM [7], l'hépatite virale B par la positivité simultanée de l'antigène HBs (Ag HBs) et de l'anti-HBc. Nous n'avons considéré comme hépatite NANB que les cas dans lesquels on avait pu éliminer le rôle des VHA et VHB, ainsi que des médicaments.

2° La recherche de l'Ag HBs et des anticorps anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc et anti-HA a été effectuée en dosage radio-immunologique (DRI) (Abbott Laboratories North, Chicago, U.S.A.). L'antigène HC (Ag HC) et l'anticorps anti-HC furent détectés par immunodiffusion en gel d'agarose selon un schéma classique et des conditions déjà décrites [5]. 5 catégories de sujets ont été étudiés (tableau) :

- (a) 5 sujets normaux;
- (b) 3 malades atteints d'hépatite aiguë médicamenteuse;
- (c) 6 cas d'hépatite à VHA;
- (d) 16 malades atteints d'infection à VHB avec Ag HBs circulant (4 hépatites aiguës, 4 hépatites chroniques persistantes, 4 hépatites chroniques actives, 4 hémodialysés);
- (e) 24 cas d'hépatite NON-A NON-B dont la moitié avec Ag HC circulant (8 aiguës, 8 chroniques persistantes, 8 chroniques actives).

Un seul sérum par cas fut étudié sauf en ce qui concerne les hépatites NANB pour lesquelles un sérum supplémentaire a pu être obtenu 2 mois plus tard. Tous ces échantillons codés furent éprouvés en aveugle.

3° Une digestion des sérums par la pepsine suivie par une concentration au polyéthylène glycol à 20 %, selon la technique de Harris [8] fut utilisée pour révéler la présence d'Ag HBs présent en quantité infime. Tous les sérums NANB étudiés furent soumis à ce traitement ainsi que 10 sérums à Ag HBs, dilués 10 fois au-dessous du seuil de détection du dosage radio-immunologique pour l'Ag HBs.

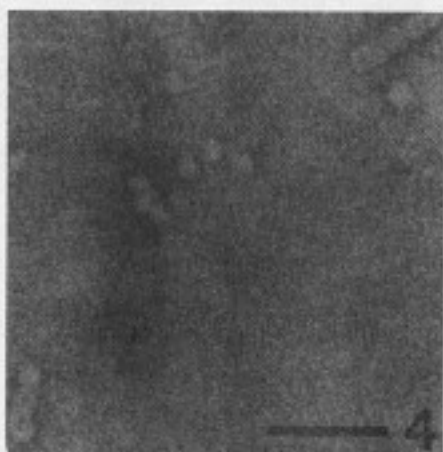
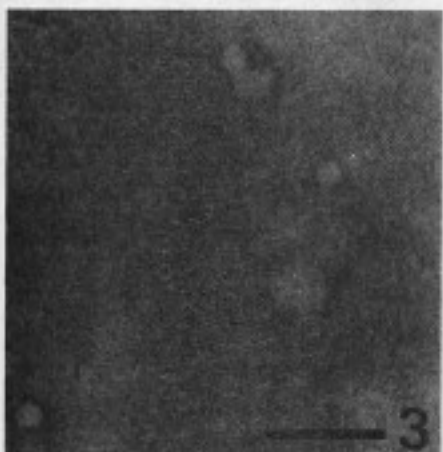
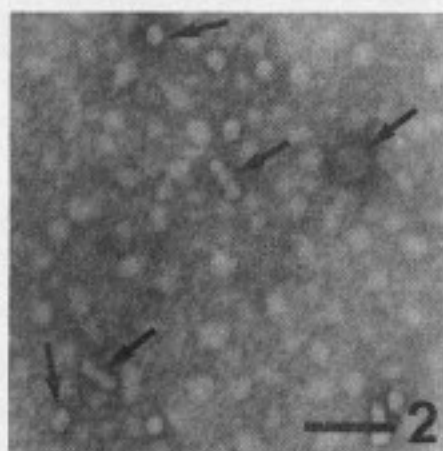
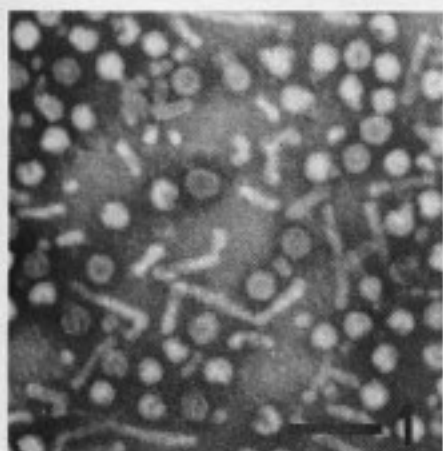
4° L'étude en microscopie électronique fut réalisée sur des culots de sérum ultracentrifugés 2 h à 50 000 tr/mn dans le « Rotor SW 50 » (Beckman) et lavés par 2 cycles de centrifugation (2 h à 50 000 tr/mn). Pour l'immunomicroscopie, les culots furent resuspendus avec des anti-HBs ou anti-HC et incubés 1 h à 37°C et une nuit à 4°C. Ces échantillons furent déposés sur des grilles de Formvar carbonées de 300 mesh, colorés par l'acide phosphotungstique à 3 % (pH = 6,0) et observés sur un microscope électronique « Elmiskop 101 » (Siemens) à 80 kV.

5° L'activité ADN polymérase fut mesurée selon la méthode de Kaplan [9] sur des sérums préalablement filtrés sur membrane de 0,45.

RÉSULTATS. — 1. *Détection de particules d'allure virale dans les sérums positifs pour l'Ag HBs et l'Ag HC.* — 74 sérums (tableau) ont été observés à raison de 2 grilles par sérum et de 5 carreaux par grilles. Seules ont été retenues les particules nettement colorées, de même taille et de même forme, retrouvées sur plusieurs champs. Les particules hétérogènes ou peu contrastées observées dans la plupart des sérums de contrôle ont été ainsi exclues. Les trois types morphologiques de particules associées à l'Ag HBs furent facilement mises en évidence dans le sérum de tous les malades qui avaient de l'Ag HBs (fig. 1), en particulier les particules de DANE, forme circulante du virion HB. Au contraire, aucune particule virale n'était détectable dans les 5 sérums contrôlés ni chez les sujets atteints d'hépatite médicamenteuse ou à VHA (tableau). Bien que moins nombreuses, des particules analogues aux précédentes furent observées dans la plupart des sérums d'hépatite NANB (fig. 2 à 5) en particulier, chez 3 des 4 hépatites aiguës et 7 des 8 hépatites chroniques avec antigénémie HC. Seuls 2 des 12 sérums d'hépatites NANB sans antigénémie HC permirent d'observer des particules de ce type. Le sérum initial ainsi que celui obtenu 2 mois plus tard au cours des hépatites chroniques fournirent des résultats analogues. Par contre, les particules n'étaient plus détectables dans les sérums des convalescents. La présence simultanée par ordre de fréquence décroissante de sphères de 15 à 25 nm, de filaments (fig. 3 et 4) et surtout de particules à double enveloppe de 35 à 40 nm (fig. 5) semblables aux particules de DANE impose l'analogie avec le VHB. Bien que morphologiquement semblables aux particules d'Ag HBs, ces sphères ou filaments n'étaient pas agglutinables par les anticorps anti-HBs ou anti-HC.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1 à 6. — Photographies de microscopie électronique : culot de particules sériques colorées négativement par l'acide phosphotungstique. Un trait représente 100 nm. 1, sérum d'un sujet hémodialysé porteur du virus HB; 2, sérum d'un malade à hépatite aiguë précoce NANB à Ag HC; 3 et 4, sérums d'un malade à hépatite chronique persistante NANB à Ag HC; 5, sérum d'un malade à hépatite active NANB à Ag HC. Les 3 formes typiques observées sont des particules rondes de 15 à 25 nm de diamètre, des bâtonnets (fig. 3 et 4) et des particules en cocarde (de 30 à 40 nm de diamètre) à double enveloppe et à centre plus dense (fig. 2 et 5) qui pour l'hépatite B (fig. 1) représentent le virus complet. Pour l'hépatite NANB (fig. 3) comme pour l'hépatite B (fig. 1) certaines de ces particules en cocarde ne présentent pas de structure interne. Sur la figure 2, les particules (indiquées par des flèches) apparaissent plus contrastées sur un fond « particulé » peu coloré dû à un excès de lipoprotéines dans le sérum étudié.



A l'inverse, des agrégats immuns étaient constamment observés lorsque les sérums antigènes HBs positifs étaient incubés avec les anticorps anti HBs. L'anticorps anti-HC était par contre incapable d'agglutiner les particules d'Ag HBs. D'autre part, après digestion pepsinique suivie de concentration au polyéthylène glycol, aucun des sérums NANB ne réagissait comme Ag HBs alors que les 10 sérums Ag HBs dilués 10 fois en dessous du seuil de sensibilité du dosage radio-immunologique retrouvaient leur positivité.

TABLEAU

Observation en microscopie électronique de sérums normaux et d'hépatites d'origines diverses

	Nombre de cas étudiés (sérum)	Sérologie		Microscopie électronique présence de		Agglutination avec		Activité ADN polymérase
		Ag HBs	Ag HC	Sphères de 22 nm et filaments	particules en cocardes	Anti-HBs	Anti-HC	
Sujets normaux de contrôle.....	5	—	—	0	0	0	0	0
Hépatites aiguës médicamenteuses.....	3	—	—	0	0	0	0	0
Hépatites aiguës à virus A.....	6	—	—	0	0	0	0	0
Sujets à antigène HBs.	16	+	—	16	16	+++	0	10
Hépatites aiguës précoces NANB.....	{ 4	—	—	—	—	0	0	0
	{ 4	—	+	3	3	0	0	2
Hépatites chroniques actives et persistantes NANB.....	{ 8 (16)	—	—	2	2	0	0	0
	{ 8 (16)	—	+	7	7	0	0	1
Convalescents d'hépatite NANB.....	4	—	—	—	—	0	0	0

2°. *Mise en évidence d'une activité ADN polymérase associée aux sérums et aux fractions d'extrait de foie positives pour l'Ag HC.* Lorsque les culots d'ultra centrifugation où les particules sériques avaient été mises en évidence ont été éprouvés pour les activités ADN polymérase, une activité significative fut observée dans 10 des 16 sérums positifs pour l'Ag HBs ainsi que dans 2 des 4 hépatites aiguës et 1 des 8 hépatites chroniques NANB. Aucune des autres catégories de sérums n'avaient d'activité ADN polymérase significative y compris les cas NANB à Ag HC négatifs.

DISCUSSION. — La détection simultanée de sphères, de filaments et de particules en cocarde à double enveloppe dans tous les sérums d'hépatites NANB positifs pour l'antigène HC au cours d'une étude codée est frappante. Ces particules, en particulier les sphères peuvent être facilement confondues avec les lipoprotéines de basse densité [10] ou avec les lipoprotéines anormales de la cholestase [11]. Mais la présence simultanée de sphères, de bâtonnets et de particules en cocarde nous paraît exclure la possibilité d'un artéfact. La démonstration d'une activité ADN-polymérase dans certains culots de ces particules confirme la nature virale de celles-ci. Le dosage radio-immunologique étant plus sensible que la microscopie électronique directe, il apparaît certain que ces particules ne portent pas l'antigénémie HBs; en effet, la technique de Harris [8], outre le gain de sensibilité, exclut (par la digestion à la pepsine) la possibilité d'un antigène HBs marqué par des protéines sériques ou des immunoglobulines (immuns complexes). L'absence

d'agglutination par l'anticorps anti-HBs est une autre preuve de cette négativité de l'Ag HBs. De toutes façons, l'absence d'anticorps anti-HBc, tout au long de l'évolution de la maladie, chez la plupart des sujets étudiés avait éliminé la possibilité d'une infection par le VHB.

La ressemblance entre particules du VHB et particules NANB n'est pas aussi surprenante qu'il y paraît initialement. En effet, les hépatites B et NANB paraissent très voisines sur les plans biologiques et épidémiologiques. D'autre part, le virus de l'hépatite de la Marmotte [12] est lui aussi morphologiquement et biologiquement très proche du VHB. Le virus NANB (ou virus C) humain identifié pour la première fois serait avec le virus de l'hépatite de la marmotte et le VHB, le troisième exemple connu d'une nouvelle famille de virus. Cette famille de virus se caractériserait morphologiquement par un grand nombre de particules circulantes non infectieuses, (petites sphères et filaments), lipoprotéines d'enveloppe synthétisée en excès, les particules en cocarde à double enveloppe et à centre dense, constituant le virus complet. Pour l'hépatite B, ces particules portent un antigène de surface HBs. L'antigène NANB que nous détectons ne semble pas être lié directement aux particules observées et n'est certainement pas un antigène de surface équivalent à l'Ag HBs.

L'existence d'un tel antigène semble pourtant probable. La fréquence des immuns complexes dans l'hépatite NANB [13] pourrait expliquer que cet antigène, peut être bloqué par des anticorps, n'ait pu encore être clairement mis en évidence. Des résultats plus précis et confirmatifs de ceux présentés ici viennent d'être obtenus dans notre laboratoire et dans celui du Dr Prince et seront rapportés ultérieurement.

Le Dr Noël et son équipe (Centre Léon-Bérard, Lyon) nous a accueilli dans son laboratoire et nous a aidé à l'observation au microscope électronique. Cette étude a été réalisée grâce à l'aide de l'Unité de Recherche de Biologie humaine, Université Claude-Bernard et de la Fondation Mérieux.

(*) Remise le 17 septembre 1979, acceptée après révision le 19 novembre 1979.

- [1] H. J. ALTER, R. H. PURCELL, P. V. HOLLAND et H. POPPER, *Lancet*, i, 1978, p. 459-463.
- [2] E. TABOR, J. A. DRUCKER, J. H. HOOFNAGLE, M. APRIL, L. F. BARKER et G. T. TAMONDONG, *Lancet*, i, 1978, p. 463-465.
- [3] R. SHIRASHI, A. TALEDA, H. SHIRASHI, K. KIKUCHI et N. ISHIDA, *Lancet*, ii, 1978, p. 853-856.
- [4] A. M. PRINCE, B. BROTMAN, M. C. VAN DEN ENDE, L. RICHARDSON et A. KELLNER, in *Viral Hepatitis* G. N. VYAS, S. N. COHEN et R. SCHMIDT, éd., The Franklin Institute Press, Philadelphia U.S.A., 1978, p. 419-421.
- [5] L. VITVITSKI, C. TREPO, A. M. PRINCE et B. BROTMAN, Submitted for publication.
- [6] C. M. LEEVY, H. POPPER et S. SHERLOCK, *Disease of the Liver and Biliary Tract*, Year Book Medical Publishers Inc. (Chicago-London), 1976.
- [7] R. H. DECKER, L. R. OVERBY, C. LING, G. FROSNER, F. DEINHARDT et J. BOGGS, *J. Infect. Dis.*, 139, 1979, p. 74-82.
- [8] R. R. HARRIS, M. SEMAR et A. JOHNSON, *J. of Laboratory and Clinical Medicine*, 90, 1977, p. 1107-1114.
- [9] P. M. KAPLAN, R. L. GREENMAN, J. L. GERIN, R. H. PURCELL et W. S. ROBINSON, *J. Virol.*, 12, 1973, p. 995-1005.
- [10] M. T. SOLAAS, *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B.*, 86, 1978, p. 125-129.
- [11] D. E. TAYLOR, J. D. ALMEIDA, A. J. ZUCKERMAN et J. M. LEACH, *Amer. J. Dis. Child.*, 123, 1972, p. 329-332.
- [12] J. SUMMERS, J. M. SMOLEC et R. SNYDER, *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, 75, 1978, p. 4523-4537.
- [13] J. L. DIENSTAG et A. K. BHAN, *Lancet*, i, 1979, p. 1265-1267.

Centre d'Épidémiologie du C.N.R.S., L.P. n° 005440, Unité I.N.S.E.R.M. U45,
Hôpital E. Herriot, 69374 Lyon Cedex 2.