

## Une nouvelle protéine du virus de l'hépatite B

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est responsable de lésions hépatiques de sévérité très variable, parfois minimales, parfois correspondant à des lésions d'hépatite chronique active pouvant évoluer vers la cirrhose. Elle représente de plus un facteur de risque majeur pour le développement du cancer primitif du foie.

Le VHB est un virus à ADN dont une des particularités est de comprendre une phase de transcription inverse au cours de sa réplication (pour revue, voir [1]). Le génome viral est constitué d'une molécule d'ADN circulaire, d'environ 3200 nucléotides, partiellement sous forme double brin. Il comprend quatre cadres de lecture chevauchants, correspondant chacun à une famille de gènes : préS/S, préC/C, P et X. La région préS/S code pour les trois protéines de l'enveloppe (préS1, préS2 et S) qui portent toutes les trois le déterminant de l'antigène de surface du virus (AgHBs). La région préC/C code pour les protéines de la capsidite et l'AgHBe. Enfin, les régions P et X correspondent aux gènes codant respectivement pour la polymérase et pour une protéine ayant une fonction transactivatrice de gènes viraux et cellulaires. En dehors des ARN classiquement décrits, dont l'ARN « pré-génome » qui permet l'expression des protéines virales et sert de matrice à la réplication du virus, des ARN résultant d'épissages alternatifs ont été mis en évidence *in vitro* dans des lignées d'hépatocarcinome [2-4]. Leur détection *in vivo*, dans le foie de patients atteints d'hépatite chronique, a permis de confirmer l'existence d'un ARN issu d'un simple épissage. Nous avons démontré que cet ARN était,

comme l'ARN « pré-génome » dont il est issu, soumis à une réaction de transcription inverse, encapsidé, et sécrété [5]. Les particules virales produites sont cependant défectives pour la réplication en l'absence d'un virus sauvage « helper » transcomplémentant qui permet l'encapsidation et la transcription inverse. La présence de ces formes défectives circulantes est associée à l'évolution de l'infection vers la chronicité [6], ce qui suggère que les protéines qui en sont issues pourraient être impliquées dans la persistance de l'infection virale.

L'épissage alternatif de cet ARN supprime environ un tiers de l'ARN « pré-génome » du VHB et est responsable de la perte de capacité traductionnelle des protéines complètes de l'enveloppe et de la polymérase (figure 1). En revanche, la capacité à produire les protéines de capsidite et X actives est conservée [7]. Cet épissage pourrait être de plus à l'origine de l'expression de nouvelles protéines. L'une d'elles, d'environ 10 kDa, est traduite à partir du codon d'initiation de la polymérase, et est constituée de deux domaines : le domaine N-terminal a une séquence identique aux premiers acides aminés de la polymérase virale tandis que le domaine C-terminal, du fait de l'épissage, a une séquence différente de celle des autres protéines virales exprimées par le VHB complet. Cette nouvelle protéine du VHB a été nommée HBSP (*hepatitis B splice protein*) et nous avons analysé d'une part son expression chez des patients atteints d'hépatite chronique due au VHB, et d'autre part son rôle dans la physiopathologie du virus [8].

La détection de la protéine HBSP a été effectuée par plusieurs approches.

Le développement d'un test ELISA indirect, utilisant un peptide correspondant à la partie originale de la protéine HBSP, nous a permis de démontrer l'existence d'anticorps dirigés contre cette protéine dans le sérum de patients atteints d'hépatite chronique due au VHB. Les sérums témoins provenaient de sujets normaux (n = 45) ou de patients atteints d'hépatite C (n = 45), d'hépatite auto-immune (n = 17) ou de cirrhose d'origine alcoolique (n = 25). Nos résultats ont montré que la réactivité moyenne était plus élevée ( $p < 0,0001$ ) dans les sérums des patients VHB (n = 45) comparés aux sérums de sujets témoins, et qu'environ 40 % des 45 patients porteurs chroniques du VHB avaient un test positif. Malgré un lien apparent entre la réplication virale et la présence d'anticorps anti-HBSP, aucune corrélation n'a pu être clairement établie, et seule l'analyse d'un plus grand nombre de patients permettra de confirmer l'existence éventuelle d'une telle corrélation. Afin de confirmer *in vivo* l'expression de la protéine HBSP, des immunoblots ont été réalisés sur des biopsies de foie provenant de cinq patients porteurs chroniques du VHB, et la protéine a été détectée dans quatre biopsies. Son niveau d'expression était cependant variable, et surtout, il n'était pas corrélé à celui des protéines virales d'enveloppe et de capsidite. Il semble donc que des mécanismes différents soient impliqués dans le contrôle de la synthèse de la protéine HBSP et de celle des autres protéines virales issues de l'ARN « pré-génome ». Cependant, le faible nombre d'échantillons analysés ne permet pas de vérifier avec certitude cette hypothèse.

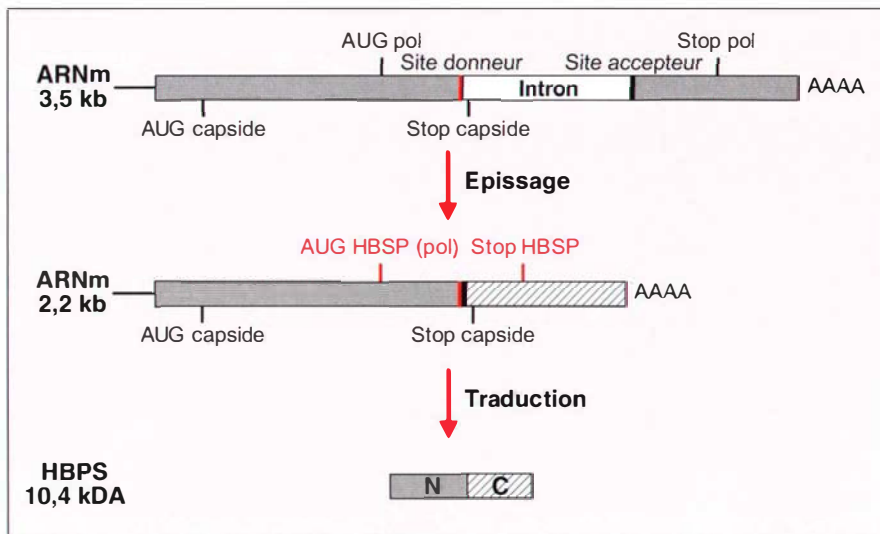


Figure 1. **Synthèse de la protéine HBSP.** L'ARNm « pré-génome » de 3,5 kb du virus de l'hépatite B (VHB) subit un épissage alternatif qui aboutit à un nouvel ARNm de 2,2 kb. Celui-ci sert de matrice pour l'expression de la protéine HBSP. Le site d'initiation de la traduction (AUG) de la protéine HBSP est le même que celui de la polymérase (pol) et la séquence amino-terminale de cette nouvelle protéine est identique à celle de la polymérase. Sa séquence carboxy-terminale est en revanche différente du fait de l'épissage alternatif.

Dans un second temps, nous avons recherché si la protéine HBSP pouvait avoir un rôle dans la pathogénie virale. Nous avons observé que la protéine, lorsqu'elle est surexprimée dans une lignée hépatocytaire, est localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules. Son action principale est de diminuer la viabilité des cellules en induisant leur apoptose : la majorité du contenu en ADN des cellules est en effet hypoploïde, et l'on observe une condensation et une fragmentation nucléaires, caractéristiques de l'apoptose. De plus, l'absence de modification du cycle cellulaire des cellules surexprimant la protéine HBSP indique que l'apoptose induite par cette protéine ne requiert pas l'arrêt préalable du cycle cellulaire. Un autre point important a été de déterminer si la protéine HBSP avait un rôle sur le cycle viral du VHB. Nous n'avons observé aucune modification de la répllication du génome

viral et de l'expression des protéines virales après surexpression de la protéine HBSP.

Bien que l'organisation génétique et le mode de répllication du VHB sont largement élucidés, ces résultats démontrent l'existence d'une nouvelle protéine virale, la protéine HBSP. Celle-ci, traduite à partir d'un ARN épissé du VHB, est exprimée dans le foie de patients porteurs chroniques du VHB et est une cible de la réponse immunitaire. *In vitro*, sa surexpression induit une apoptose massive par une voie indépendante du cycle cellulaire. Son absence d'effet direct sur la répllication virale n'exclut toutefois pas un effet sur la pathogénie virale. En effet, l'apoptose cellulaire joue un rôle important dans la régulation du cycle viral et de la pathogénie de nombreux virus à ADN ou ARN [9]. Dans le cas du VHB, il est établi que c'est la réponse immunitaire de l'hôte qui détermine

la clairance virale [10]. On peut cependant envisager que la protéine HBSP, par son action apoptotique, contribue au contrôle de la viabilité des hépatocytes infectés et soit impliquée dans la persistance de l'infection virale.

1. Fourel G, Tiollais P. Molecular biology of hepatitis B virus. In: Brechot C, ed. Primary liver cancer: etiological and progression factors. London: CRC Press, 1994: 89-124.
2. Su TS, Lai CJ, Huang JL, et al. Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. *J Virol* 1989; 63: 4011-8.
3. Susuki T, Masui N, Kajino K, Saito I, Miyamura T. Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989; 86: 8422-6.
4. Susuki T, Kajino K, Masui N, Saito I, Miyamura T. Alternative splicing of hepatitis B virus RNAs in HepG2 cells transfected with the viral DNA. *Virology* 1990; 79: 881-5.
5. Terré S, Petit MA, Bréchet C. Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs *in vivo*. *J Virol* 1991; 65: 5539-43.
6. Rosmorduc O, Petit MA, Pol S, et al. *In vivo* and *in vitro* expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA. *Hepatology* 1995; 22: 10-9.
7. Rosmorduc O, Sirma H, Soussan P, et al. Inhibition of interferon-inducible MxA protein expression by hepatitis B virus capsid protein. *J Gen Virol* 1999; 80: 1253-62.
8. Soussan P, Garreau F, Zylberberg H, Ferray C, Brechot C, Kremsdorf D. *In vivo* expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest* 2000; 105: 55-60.
9. O'Brien V. Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* 1998; 79: 1833-45.
10. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 206: 149-73.

**Patrick Soussan  
Florianne Garreau  
Christian Bréchet  
Dina Kremsdorf**

*Inserm U. 370, Carcinogénèse hépatique et virologie moléculaire, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris, France.*