

## Le gène X du virus de l'hépatite B : transactivateur et oncogène potentiel

Le gène *HB-X* du virus de l'hépatite B (VHB) code pour une protéine minoritaire de 17 kDa qui est un nouveau marqueur de l'infection virale. La protéine X est une sérine thréonine kinase d'un nouveau type qui a des propriétés transactivatrices sur le génome viral, ainsi que sur des gènes cellulaires dépendant des ARN polymérase II ou III. La transactivation est probablement le fruit de l'interaction entre la protéine X et des facteurs transcriptionnels cellulaires qui pourraient être eux-mêmes activés ou dont la spécificité pourrait être modifiée. De nombreuses expériences et observations indiquent que le gène *HB-X* a un potentiel oncogénique et intervient donc peut-être dans les hépatocarcinomes compliquant les infections chroniques par le VHB.

---

Émile Elfassi

---

**L**e virus de l'hépatite B (VHB) appartient à une famille de virus appelés *hepadnaviridae* [1-4]. La structure, l'organisation génétique et les propriétés biologiques particulières des *hepadnaviridae* les distinguent de toutes les autres familles de virus. Le VHB est l'un des plus petits virus animaux connus (3 200 pb). Son génome est constitué d'une molécule d'ADN circulaire partiellement double brin. Son organisation génétique est très compacte et contient quatre phases ouvertes de lecture (ORF, *open reading frame*) se situant sur le même brin, de même polarité et se chevauchant les unes les autres (*figure 1*). L'expression du

répertoire génétique est soumise à une régulation transcriptionnelle particulièrement complexe qui fait intervenir de nombreuses séquences régulatrices présentes dans les séquences codantes. La réplication met en jeu une stratégie similaire à celle des rétrovirus nécessitant un intermédiaire ARN, appelé ARN pré-génomique et contenant des séquences terminales répétées [5]. En ce qui concerne leurs propriétés biologiques, ces virus peuvent causer des hépatites aiguës, chroniques [6] et ils sont impliqués dans le développement des hépatocarcinomes [7] (*m/s n° 3, vol. 6, p. 306*).

Sur quatre ORF présentes dans le génome du VHB, on ne pouvait

---

### ADRESSE

---

É. Elfassi : chargé de recherche à l'Institut Pasteur. Unité d'immunologie microbienne, Institut Pasteur, 28, rue du docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

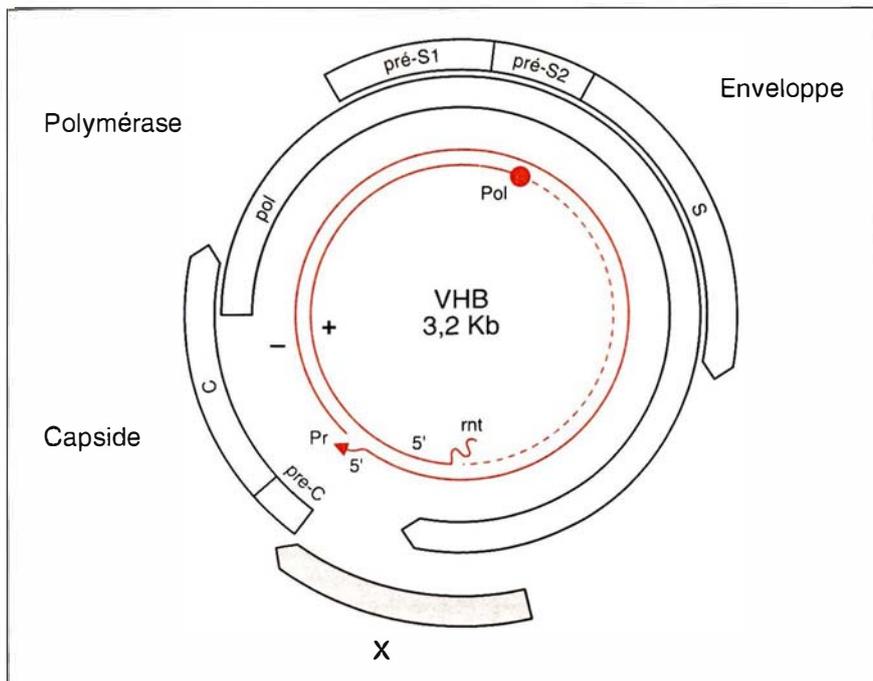


Figure 1. **Structure, organisation génétique et produits du génome du VHB.** La molécule d'ADN partiellement double brin constituant le génome du VHB est représentée. Une protéine (Pr) est attachée de façon covalente à l'extrémité 5' du brin codant (-). Un oligoribonucléotide (rnt) est fixé à l'extrémité 5' du brin (+). L'ADN polymérase (Pol) est représentée à l'extrémité 3' du brin (+). Le brin codant (-) contient quatre phases ouvertes de lecture, S, C, pol et X, de même polarité et se chevauchant les unes les autres. Les protéines exprimées par ces gènes sont indiquées.

décélérer la présence que de trois protéines correspondantes. Les deux protéines quantitativement prédominantes sont représentées par les constituants de l'enveloppe du virion et la nucléocapside couramment dénommée *core* (figure 1). La troisième protéine, l'ADN polymérase, est retrouvée associée au génome viral à l'intérieur de la capsid et elle y représente un composant mineur du virion. Sa présence est démontrée par ses activités-ADN et ARN polymérasiques dépendantes.

Jusqu'à un passé récent, rien n'était connu en ce qui concerne l'ORF-X. Ni protéine ni fonction n'ont d'abord pu être assignées à cette ORF. A partir de la séquence nucléotidique, un produit de 154 acides aminés pouvait être synthétisé. Le rôle et

l'importance de cette ORF ont été ignorés dans la mesure où les *hepadnaviridae* aviaires — notamment ceux du canard (DHBV), plus abordables expérimentalement, et qui partagent les principales propriétés biologiques et biochimiques des *hepadnaviridae* de mammifères — ne possèdent pas d'ORF-X. De plus, pendant fort longtemps la protéine X n'a pu être identifiée ni dans le virion ni dans les cellules infectées où sa présence y demeure encore discutée.

Cette ORF fait aujourd'hui l'objet d'études intensives. Les résultats récents ont permis de caractériser cette ORF comme étant un gène fonctionnel, codant pour une protéine immunogène constituant un nouveau marqueur sérologique. Cette protéine serait une nouvelle protéine kinase et

aurait une fonction de transactivateur transcriptionnel. Enfin, cette protéine pourrait être un facteur essentiel de l'hépatocarcinogénèse virale.

Dans cette revue, nous essaierons d'analyser la structure de l'ORF-X et celle de la protéine X, la biogenèse de cette dernière, son rôle dans le cycle viral ainsi que son implication éventuelle dans le développement de l'hépatocarcinome.

### HB-X, un nouveau marqueur sérologique

La première mise en évidence de la protéine X n'a été faite que récemment et indirectement. En effet, cette protéine n'a pu être décelée aisément durant l'infection *in vivo* [8]. En fait, la présence de la protéine X a été déduite de la mise en évidence d'anticorps anti-X dans le sérum de patients infectés. Cela a pu être réalisé tout d'abord en exprimant dans les bactéries appropriées la protéine X fusionnée à une protéine indicatrice telle que la  $\beta$ -galactosidase [9]. Des sérums provenant de patients infectés se sont avérés réagir en radio-immunoprécipitation, vis-à-vis d'extraits protéiques radiomarqués provenant de bactéries exprimant la protéine hybride. Des anticorps anti-X ont pu être également décelés par immunofluorescence indirecte, ELISA indirect, *Western blot*, en utilisant selon les cas, comme source d'antigène, soit une protéine X exprimée par un vecteur d'expression dans les cellules eucaryotes transfectées, soit des peptides synthétiques recouvrant à peu près l'ensemble de la protéine X [10]. Néanmoins, les résultats obtenus varient selon les auteurs et une corrélation des anticorps anti-X avec les marqueurs sérologiques classiques (antigènes HBs, HBc et HBe) est difficile à prouver. Cette variation, souvent importante de prévalence d'anti-X, suivant les études, peut refléter des problèmes méthodologiques. Il semblerait néanmoins que deux notions se dégagent de ces études. La première est qu'il semble exister une relation entre la présence d'anti-X et la multiplication virale. La deuxième est que seul un nombre restreint d'individus développent une réponse humorale anti-X. En conclusion, la région X code pour une protéine ; cette protéine est plus ou

## RÉFÉRENCES

1. Zuckerman AJ. *Human Viral Hepatitis*. Amsterdam, Oxford : North-Holland Publishing Company, 1975.
2. Tiollais P, Pourcel C, Dejean C. The hepatitis B virus. *Nature* 1985 ; 317 : 489-95.
3. Pourcel C. Souris transgéniques pour le génome du virus de l'hépatite B. *médecine/sciences* 1989 ; 5 : 626-36.
4. Kremsdorf D, Thiers V, Garneau F, et al. Variabilité génétique du virus de l'hépatite B et son expression sérologique. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 108-16.
5. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982 ; 29 : 403-15.
6. Degos F, Benhamou JP. Le traitement des hépatites chroniques. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 117-24.
7. Tiollais P, Dejean A, Buendia MA. Virus de l'hépatite B et hépatocarcinome. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 96-7.
8. Pfaff E, Salfeld J, Gmelin K, Schaller H, Theilmann L. Synthesis of the X-protein of hepatitis B virus *in vitro* and detection of anti-X antibodies in human sera. *Virology* 1987 ; 158 : 456-60.
9. Elfassi E, Haseltine WA, Dienstag JL. Detection of hepatitis B virus X product using an open reading frame *Escherichia coli* expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 2219-22.
10. Persing DH, Varmus HE, Ganem D. Antibodies to pre-S and X determinants arise during natural infection with ground squirrel hepatitis virus. *J Virol* 1986 ; 60 : 177-84.
11. Miller RH, Robinson WS. Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 2531-5.
12. Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem* 1987 ; 56 : 651-93.
13. Guo W, Wang J, Tam G, Benedict Yen TS, Ou J. Leaky transcription termination produces larger and smaller than genome size hepatitis B virus X gene transcripts. *Virology* 1991 ; 181 : 630-6.

moins immunogène chez l'homme et représente un nouveau marqueur sérologique. Il est prématuré de tirer des enseignements concernant la cinétique d'apparition de l'antigène X ou de la réponse anticorps qui lui est associée, ainsi que des conclusions concernant les corrélations avec un stade particulier de la maladie hépatique.

## Caractéristiques du gène X

L'ORF X, située entre les gènes S et C, représente la plus petite des ORF du génome et peut coder pour une

protéine, selon le sous-type viral considéré, de 145 à 154 aa.

La structure de ce gène apparaît comme étant la plus complexe du génome. Elle est comprise dans une région responsable du maintien de la structure circulaire de celui-ci parce que contenant les deux extrémités 5' des brins (-) et (+) (figure 1). Elle contient aussi plusieurs séquences régulatrices extrêmement importantes pour la réplication et la transcription, telles que DR1 et DR2 qui servent d'amorce lors de la synthèse de l'ADN viral, le promoteur du gène C qui permet la synthèse de l'ARN pré-génomique (voir ci-dessous) et l'acti-

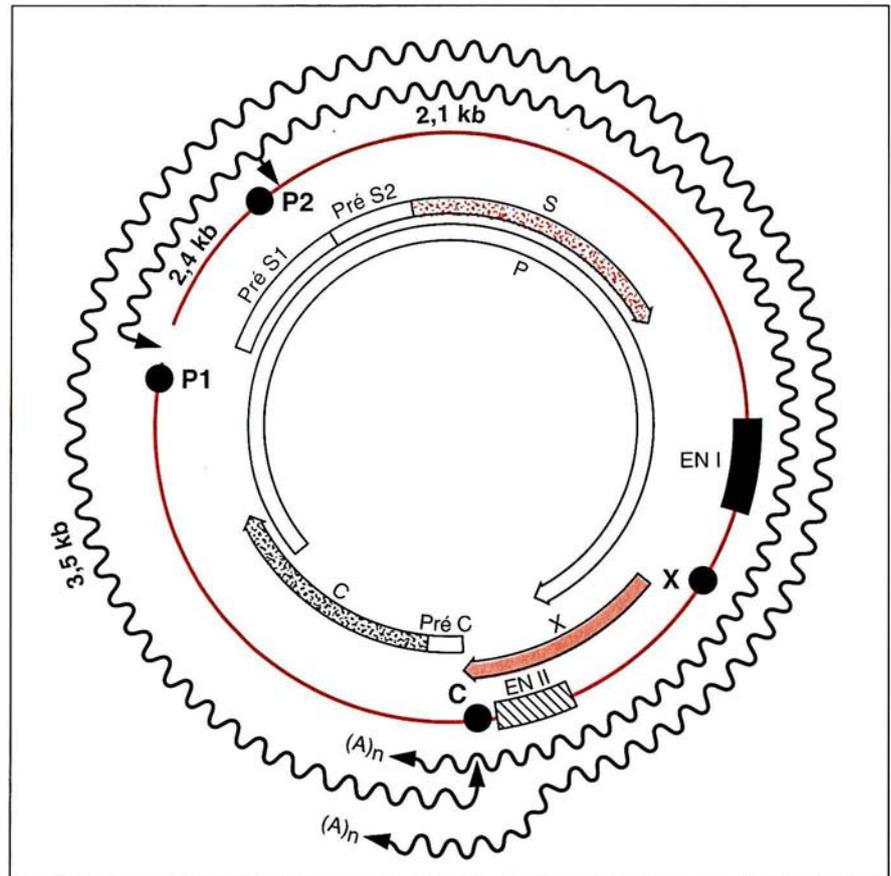


Figure 2. **Gènes et transcrits du virus VHB.** Les quatre ORF, S, C, pol et X sont indiquées. Les promoteurs P1, P2, X et C sont représentés par •. L'activateur transcriptionnel EnI est situé dans la partie 3' terminale du gène pol et contient les séquences XRE. L'activateur EnII est situé dans le gène X. Le transcrit génomique de 3,5 kb et les transcrits subgénomiques de 2,4 kb et 2,1 kb sont représentés par un trait ondulé. L'unique signal de polyadénylation (A)<sub>n</sub> se trouve dans le gène C. Ces deux transcrits sont décelables *in vivo*. Les transcrits de 0,7 kb et 3,9 kb synthétisés à partir du promoteur X, et décelés jusqu'à présent seulement *ex vivo*, ne sont pas représentés.

vateur transcriptionnel II (EnII) qui contrôle l'activité des promoteurs du génome viral (figure 2). La taille de la région X, qui représente 14,5 % de la capacité codante totale du génome, est variable chez les *hepadnaviridae*, mais la présence de deux autres AUG en plus du codon d'initiation de la traduction y est toujours observée. L'analyse des nucléotides flanquant le site d'initiation à la traduction révèle que le deuxième AUG est pourtant dans le contexte nucléotidique le plus favorable à l'initiation de la traduction.

L'analyse relative à l'utilisation préférentielle de codons dans le gène X suggère que ce gène ainsi que la région activatrice du génome du VHB ont une origine cellulaire [11]. Dans un tel contexte, on peut penser que, d'une part, le gène X pourrait être d'origine cellulaire et que, d'autre part, une deuxième protéine X pourrait être synthétisée à partir du second AUG.

## Biogénèse

### • Transcrits du VHB *in vivo*

*In vivo* dans les foies infectés, on détecte classiquement deux catégories d'ARN. La première est constituée d'un ARN génomique de 3,5 kb ; la seconde, d'ARN subgénomiques de 2,1 et 2,4 kb [12]. Tous ces ARN sont de polarité positive, non épissés, polyadénylés à un site commun (figure 2). S'il paraît très difficile de détecter la protéine X *in vivo*, il n'a pas été non plus possible de détecter clairement un ARNm spécifique correspondant à la séquence X. Récemment, des transcrits épissés du VHB ont été décrits. Cependant, ces transcrits ne sont pas régulièrement observés et leur produit reste non identifié [13].

L'ARN de 3,5 kb, plus long que le génome (3,2 kb), contient des extrémités terminales redondantes. Cet ARN, qui constitue un pré-génome, a une double fonction de réplication et de traduction [5] : fonction de réplication, car les *hepadnaviridae* se répliquent *via* une transcription inversée, à partir de cette molécule linéaire d'ARN pré-génomique ; fonction de traduction, car ce pré-génome sert également d'ARN messager pour la

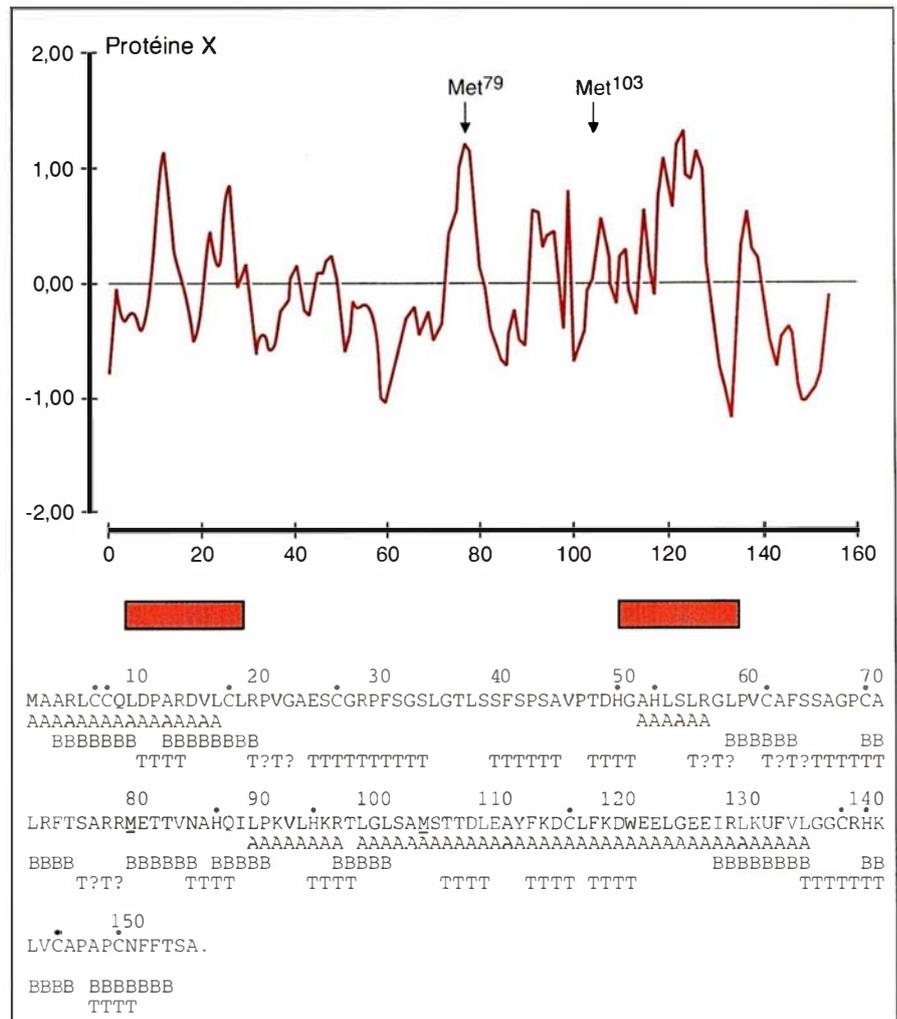


Figure 3. Profil d'hydrophilie et structure secondaire de la protéine X du VHB. Les rectangles représentent les régions très conservées de la protéine parmi tous les sous-types. Les méthionines aux positions 79 et 103 sont soulignées et les différentes cystéines et histidines sont indiquées. Les acides aminés sont indiqués selon leur code à une lettre. La courbe supérieure est celle du profil d'hydrophilie. Les indications situées sous la séquence des acides aminés signifient : A, régions présomptivement en hélices  $\alpha$  ; B, régions présomptivement en feuillet  $\beta$  ; T, régions formant présomptivement des coude.

synthèse de la protéine de capsid et de l'ARN polymérase [14].

Les ARNm subgénomiques de 2,4 kb et 2,1 kb codent, eux, pour les antigènes d'enveloppe.

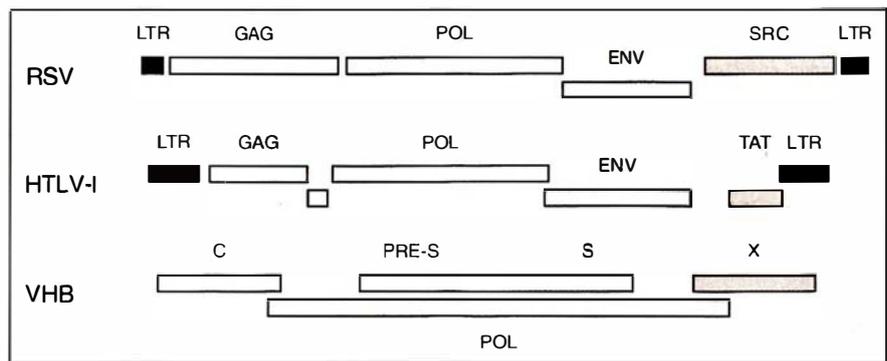
L'existence d'un ARN spécifique de la région X aurait été toutefois retrouvée dans les foies de marmottes infectés par l'hepadnavirus correspondant ; quoi qu'il en soit, il n'y est mentionné qu'à l'état de trace, puisque représentant moins de 1 % des ARN viraux. Il s'agirait d'un transcrit de 0,65 kb essentiellement localisé dans le noyau des cellules infectées. La majorité de cet ARN serait

non polyadénylée [15]. La faible quantité et l'absence de polyadénylation expliqueraient la difficulté à détecter ce transcrit *in vitro*.

### • Transcrits du VHB *ex vivo*

Si, *in vivo*, il n'est pas possible ou très difficile de détecter un ARN spécifique des séquences X, *ex vivo*, il a été démontré qu'un génome VHB transfecté dans des cellules hépatiques est capable de produire, en plus des ARN génomiques et subgénomiques, un ARN de 0,7 kb, spécifique de la région X [12].

Une étude récente effectuée dans un système *ex vivo* a révélé l'existence



## RÉFÉRENCES

14. Chang LJ, Ganem D, Varmus HE. Mechanism of translation of the hepadnaviral polymerase (P) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 5158-62.
15. Kaneko S, Miller RH. X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver. *J Virol* 1988 ; 62 : 3979-84.
16. Feitelson MA, Clayton MM, Phimister B. Monoclonal antibodies raised to purified woodchuck hepatitis virus core antigen particles demonstrate X antigen reactivity. *Virology* 1990 ; 177 : 357-66.
17. Treinin M, Laub O. Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol Cell Biol* 1987 ; 7 : 545-8.
18. Colgrove R, Simon G, Ganem D. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J Virol* 1989 ; 63 : 4019-26.
19. Wu JY, Zhou ZY, Judd A, Cartwright CA, Robinson WS. The hepatitis B virus-encoded transcriptional trans-activator HBX appears to be a novel protein serine/threonine kinase. *Cell* 1990 ; 16 : 687-95.
20. Twu J-S, Schloemer RH. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J Virol* 1987 ; 6 : 3448-53.
21. Elfassi E. Broad specificity of the hepatitis B enhancer function. *Virology* 1987 ; 160 : 259-62.
22. Vannice JL, Levinson AD. Properties of the human hepatitis B virus enhancer : position effects and cell-type nonspecificity. *J Virol* 1988 ; 62 : 1305-13.
23. Dikstein R, Faktor O, Ben-Levy R, Shaul Y. Function organization of the hepatitis B virus enhancer. *Mol Cell Biol* 1990 ; 10 : 3883-9.
24. Helbecque N, Hélichart JP. Les « doigts à zinc », éléments de reconnaissance de l'ADN. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 624-8.
25. Unger T, Shaul Y. The X protein of the hepatitis B virus acts as a transcription factor when targeted to its responsive element. *EMBO J* 1990 ; 9 : 1889-95.

Figure 4. **Comparaison de la structure du génome du VHB avec celle de deux rétrovirus et localisation du gène X.** La structure linéaire de la molécule d'ADN du VHB peut être obtenue par la linéarisation à partir des extrémités cohésives et l'élongation des régions simples brins. Le gène X se retrouve à une position équivalente à celle du gène oncogène sarc du virus du sarcome de Rous (RSV) et du gène transactivateur tat (ou tax) de HTLV-I. Les séquences terminales du VHB contiendraient les séquences répétées DR1 et DR2, dans des positions analogues aux LTR (long terminal repeat) des rétrovirus.

d'un nouveau transcrit de 3,9 kb contenant deux copies du gène X à chacune de ses extrémités [13]. La transcription de cet ARN débute à partir du promoteur X (voir ci-dessous). L'ARN polymérase II ignore le signal de polyadénylation lors du premier passage et la lecture du transcrit se termine après le second passage au niveau de ce même signal. Dans ces conditions, à partir du promoteur X, un ARN synthétisé sur deux constitue l'ARN de 3,9 kb. Le rôle de cet ARN de 3,9 kb n'est pas encore élucidé, mais il pourrait permettre, par glissement ribosomique, la synthèse d'une protéine fusionnée X-C, d'ailleurs décrite auparavant chez les *hepadnaviridae* de mammifères par plusieurs auteurs [16].

Il est important aussi de souligner que tous les transcrits génomiques et subgénomiques contiennent la séquence X. En effet, leur extrémité 3' est commune, située à quelque 20 nucléotides en aval de l'hexanucléotide conservé TATAAA des séquences codantes du gène C, c'est-à-dire après le gène X (figure 2).

### • Promoteur du gène X

Les essais de transfections transitoires de cellules hépatiques par des vecteurs d'expression codant pour l'enzyme CAT sous le contrôle de la région d'amont du gène X, ont permis de localiser un promoteur [17].

Celui-ci ne contient pas de séquences de type TATA et nécessite une région activatrice (EnI) pour son fonctionnement. La cartographie de l'extrémité 5' des ARN-X révèle l'existence de transcrits hétérogènes avec de multiples sites d'initiation (trois sites majeurs et deux sites mineurs) s'échelonnant sur une longueur de 100 nucléotides. De ces études *ex vivo*, il apparaît que le gène X s'exprime à partir de sa propre unité transcriptionnelle.

### • Caractéristiques structurales de la protéine X ; localisation et activité kinase

Cette protéine ne présente pas d'homologies évidentes avec les autres protéines connues. L'étude des algorithmes prédit une protéine soluble, intracellulaire, sans séquence signal et sans autres motifs particulièrement marquants. Deux motifs compris entre les résidus 1 à 25 et 114 à 140 seraient très conservés, hydrophobes, avec des hélices  $\alpha$  interrompues par des dipeptides cystéines ou glycines (figure 3).

La transfection stable de cellules hépatiques par des vecteurs d'expression X a permis d'étudier la localisation de la protéine, qui apparaît surtout nucléaire mais aussi, plus accessoirement, cytoplasmique [18].

Récemment, la protéine X a été caractérisée dans les virions préparés

à partir d'un plasma provenant d'un porteur chronique du VHB. Cette protéine aurait une activité sérine-thréonine kinase [19]. Le fait que la protéine X n'ait que peu d'homologies avec les protéines kinases connues et qu'elle paraisse être sous une forme monomérique, suggère fortement qu'elle puisse être une nouvelle catégorie de protéine kinase.

En conclusion, nous ne savons pas lequel des ARN viraux sert de matrice à la traduction *in vivo*. La protéine X pourrait être traduite à partir d'un transcrite mineur initié à partir du promoteur X ou à partir de n'importe quel ARN viral subgénomique (2,4 et 2,1 kb) ou génomique (3,5 kb) ou encore de l'ARN de 3,9 kb récemment décrit, puisque tous contiennent les séquences X. La synthèse de la protéine X à partir de ces ARN peut se faire de façon peu efficace soit par une initiation interne, soit par glissement ribosomique. Il est possible qu'une seconde protéine X soit initiée à partir du second codon et soit constituée, dans ce cas, de 78 aa. Ainsi, de la même manière qu'il existe une région pré-S/S, une région pré-C/C, il pourrait exister aussi une région pré-X/X. Par ailleurs, des études immunologiques suggèrent l'existence de polypeptides associés à la capsid du virus qui posséderait alors deux types de déterminants antigéniques à la fois, des épitopes C et X. Quoi qu'il en soit, la localisation de cette protéine, qui apparaît être en concentration faible dans la cellule, demeure imprécise. Enfin, la protéine X aurait été décelée dans les virions avec une activité sérine-thréonine kinase.

### Propriété transactivatrice du gène X

La protéine X est un élément de régulation avec un effet transactivateur [20]. Il existe d'ailleurs quelques analogies structurales entre l'ORF-X du VHB et certaines ORF codant pour une protéine transactivatrice et/ou transformante (figure 4). Ce sont ces deux propriétés, non exclusives d'ailleurs, qui seront analysées dans cette revue. Signalons que les propriétés transactivatrices du VHB ne sont pas limitées à la protéine X puisque des formes de protéines

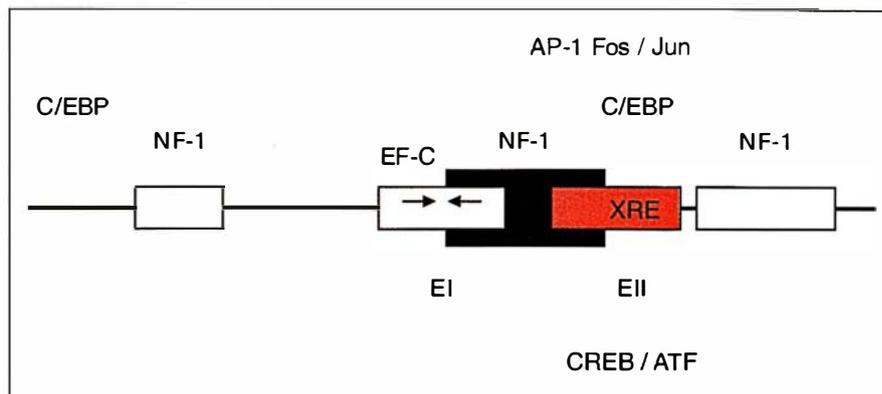


Figure 5. **Domaines fonctionnels de l'enhancer du VHB (EnI).** L'enhancer du VHB est composé de plusieurs modules représentés par des rectangles. Deux d'entre eux, EI et EII, sont essentiels à son activité. Le motif EI contient des séquences inversées représentées par des flèches. Les facteurs transcriptionnels se fixant à ces motifs sont indiqués. Le facteur NF-1 (nuclear factor-1) se fixe à trois sites : C/EBP à deux sites ; EF-C et AP-1 (Jun-Fos) à un site. Les facteurs se liant à l'élément de réponse à la transactivation par la protéine X (XRE) sont AP-1 et C/EBP. Les facteurs CREB/ATF-2 ne se fixent au enhancer du VHB (sur un site homologue au CRE) qu'après avoir formé un complexe avec la protéine X.

d'enveloppe S et pré-S tronquées possèdent également cette activité (*m/s* n° 3, vol. 6, p. 306).

### • Séquence de réponse à la transactivation dans le génome VHB : la région enhancer (EnI)

Le gène X a été cloné dans des vecteurs d'expression et sa capacité à augmenter l'expression de promoteurs-activateurs du génome VHB, dans différents contextes cellulaires, a été analysée [20]. Les résultats montrent que les séquences de réponse à la transactivation dans le génome du VHB sont localisées dans la région enhancer (EnI), située dans le gène *pol*, juste en amont du gène X. La protéine X agit au niveau de la transcription et vraisemblablement au niveau de l'initiation. Le EnI augmente le taux d'initiation de la transcription de gènes hétérologues à partir du site d'initiation, et ceci indépendamment de son orientation et de sa distance par rapport à la séquence à transcrire. Ce enhancer ne présente pas de spécificité tissulaire stricte [21, 22]. Il apparaît composé de plusieurs modules ou éléments, deux d'entre eux étant essentiels à l'activité enhancer du VHB (figure 5). L'élément majeur de l'enhancer est EII. Celui-ci

a une activité enhancer intrinsèque ; il est de plus stimulé par les esters de phorbol [23]. L'élément EI n'a pas d'activité enhancer intrinsèque mais représente un élément essentiel à la fonction.

— Séquences XRE et facteurs de transcription

#### (1) AP-1/Jun-Fos et C/EBP :

L'étude de mutants dans la région enhancer a permis de localiser une courte séquence appelée XRE (*X-responsive element*) impliquée dans la transactivation par la protéine X [20]. Le XRE est situé dans l'élément EII (figure 5). Les tentatives visant à révéler une fixation de la protéine X purifiée à ce enhancer du VHB avec les techniques sur gel de retardement et d'empreintes à la DNase se sont avérées négatives. Pourtant, la présence de motifs très bien conservés permettant à la protéine X d'adopter une structure en forme de doigt à zinc [24] est retrouvée chez les différents sous-types du virus. Il semblerait donc que la protéine X puisse augmenter indirectement la transcription du VHB en interagissant plutôt avec des facteurs transcriptionnels se liant à l'élément EII du enhancer. Des études antérieures ont révélé que le

## RÉFÉRENCES

26. Pei D, Shih C. Transcriptional activation and repression by cellular DNA-binding protein C/EBP. *J Virol* 1990 ; 64 : 1517-22.
27. Picette J, Hirai SI, Yaniv M. Constitutive synthesis of activator protein 1 transcription factor after viral transformation of mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 3401-5.
28. Landschulz WH, Johnson PF, Adashi EY, Graves BJ, McKnight SL. Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev* 1988 ; 2 : 786-800.
29. Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fisher WH, et al. A cluster of phosphorylation sites on the cyclin AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 1989 ; 337 : 749-52.
30. Maguire HF, Hoefler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991 ; 252 : 842-4.
31. Goodarzi G, Ohno H, Adams R, et al. Mutational analysis of enhancer domains responsive to trans-activation by the X gene of human hepatitis B virus. *Arch Virol* 1990 ; 114 : 237-42.
32. Ostapchuk P, Diffley JFX, Bruder JT, Stillman B, Levine AJ, Hearing P. Interaction of a nuclear factor with the polyoma-virus enhancer region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 8550-4.
33. Ostapchuk P, Scheirle G, Hearing P. Binding of nuclear factor EF-C to a functional domain of the hepatitis B virus enhancer region. *Mol Cell Biol* 1989 ; 9 : 2787-97.
34. Aufiero B, Schneider RJ. The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990 ; 9 : 497-504.
35. Zhou D-X, Taraboulos A, Ou J-H, Benedict Yen TS. Activation of class I major histocompatibility complex gene expression by hepatitis B virus. *J Virol* 1990 ; 64 : 4025-8.
- enhancer du VHB interagit avec de nombreux facteurs transcriptionnels (figure 5). Deux de ces facteurs, AP-1/Jun-Fos et C/EBP, ont été montré capables de se fixer au XRE [25, 26].
- AP-1/Jun-Fos (*activating protein-1*) est constitué par les produits des proto-oncogènes nucléaires *c-jun* et *c-fos* [27]. AP-1 interagit avec de nombreux gènes stimulés par les facteurs de croissance et par certains agents inducteurs comme le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate). C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) [28] est capable de se lier sélectivement au moins à deux motifs différents : le motif 5'CCAAT-3', présent dans de nombreux promoteurs, et le motif 5'TGTGGATATATG-3', commun à plusieurs *enhancers* viraux [26, 27]. C/EBP active de nombreux promoteurs de gènes hépatocytaires et adipocytaires (*m/s n° 3, vol. 7, p. 288*).
- Les expériences d'empreinte à la DNase I ont montré que c-Jun se fixe à un seul site et que C/EBP se fixe à au moins deux sites de la région *enhancer*. Les expériences de co-transfection de cellules hépatiques par des vecteurs d'expression de c-Jun ou de C/EBP avec le *enhancer* du VHB montrent que c-Jun agit comme activateur et C/EBP comme activateur ou répresseur. Cette capacité à contrôler positivement et/ou négativement la transcription du VHB dépend de la concentration de C/EBP dans la cellule. A faible concentration, C/EBP agit comme activateur et, à forte concentration, comme répresseur [26]. Le mécanisme de l'activation et de la répression transcriptionnel par C/EBP n'est pas encore élucidé. Il peut paraître *a priori* difficile de concilier une répliation virale particulièrement intense dans l'hépatocyte avec une présence abondante de C/EBP dans cette même cellule où les données, *ex vivo*, indiquent qu'elle induit une forte répression de la transcription du VHB. Il est probable qu'un autre facteur positif doit interférer avec l'effet répresseur de C/EBP et la protéine X pourrait être ce candidat. Il est aussi possible que la teneur des hépatocytes en C/EBP conditionne leur taux de répliation virale, les hépatocytes ayant une concentration faible en C/EPB étant le siège privilégié d'une répliation virale intense. Dans ce contexte, la chronicité et la latence de l'infection virale pourraient être en relation avec l'activité répresseur de C/EBP.
- (2) CREB et d'ATF-2 :
- Les facteurs transcriptionnels CREB (*cyclic AMP response element binding protein*) et ATF-2 (*activating transcription factor*) sont des médiateurs de la réponse à l'induction par l'AMP cyclique [29]. Ces facteurs se fixent au motif CRE (5'-TGACGTCA-3') présent dans de nombreux promoteurs cellulaires. Récemment, il a été montré que l'élément I du *enhancer* du VHB contenait un motif similaire à CRE (*cAMP response element*). Cependant, il n'a pas été détecté de fixation sur cette région du génome, avec des extraits nucléaires hépatocytaires ou avec des protéines CREB et ATF-2 partiellement purifiées. De façon surprenante, l'addition de la protéine X à de telles préparations induit la fixation de CREB et d'ATF-2 à la région contenant le motif similaire à CRE. Une série d'expériences suggère que la protéine X fait bien partie intégrante du complexe protéique se fixant au *enhancer* du VHB [30]. La fixation de CREB et ATF-2 à l'élément CRE du motif E2 pourrait ainsi nécessiter un changement conformationnel induit par leur interaction avec la protéine X, ou encore par l'activité kinase associée à la protéine X. Cet exemple illustre la capacité de la protéine X à modifier des facteurs tels que CREB ou ATF-2 et à permettre ainsi leur fixation à des sites qui ne présentent aucune affinité ou une affinité faible pour ces facteurs natifs. Une telle stratégie peut permettre de régler l'expression des gènes cellulaires pendant l'infection virale.
- Selon une autre étude, le domaine du *enhancer* impliqué dans la transactivation par la protéine X serait localisé dans le module EI (figure 5) ; celui-ci est par ailleurs le site de fixation du facteur transcriptionnel ubiquitaire EF-C (*enhancer binding factor to polyoma element C*) [31]. Ce dernier se fixe sur l'élément C de la région *enhancer* du polyome, sur un motif contenant les séquences inversement répétées (5'-GTTGCNNGCAAC-3') [32]. Un tel motif est retrouvé dans la région

enhancer du VHB [33]. Quoi qu'il en soit, les rôles qui se dégagent de ces deux études ne sont en rien exclusifs.

#### • Transactivation de séquences régulatrices hétérologues

La protéine X est également capable de transactiver de nombreux promoteurs de classe II\* ainsi que certains promoteurs de classe III\* viraux et cellulaires [34]. Les essais de transactivation par une protéine X purifiée à partir de bactéries l'exprimant, ou traduites *in vitro*, révèlent qu'ainsi synthétisée, celle-ci garde son pouvoir transactivateur. La transactivation est inhibée par un inhibiteur des protéine kinases [19]. Il semble donc bien exister une association entre la fonction de transactivation et une activité kinase. Le niveau de la transactivation est variable selon les promoteurs et selon le contexte cellulaire et tous les promoteurs transactivés ne partageant pas d'homologies de séquences évidentes. Afin d'illustrer la variété et la complexité des séquences transactivées par la protéine X, nous décrivons trois exemples de transactivation de gènes pouvant avoir une signification biologique définie. Il s'agit de l'activation : d'un gène du CMH de classe I codant pour une molécule exerçant un rôle clé dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire ; de gènes pouvant jouer un rôle dans la transformation ; enfin du virus de l'immuno-déficience humaine capable d'être réactivé de son état de latence par le VHB, *in vitro*.

— Promoteurs des gènes codant pour des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH de classe I) Les hépatocytes normaux n'expriment que très peu de molécules du CMH-I, tandis que les cellules répliquant le VHB en expriment trois à quatre fois plus. L'induction de cette augmentation est due à la protéine X [35]. Deux éléments sont impliqués dans la régulation des gènes CMH-I ; d'une part, le motif IRE (*interferon responsive element*) et, d'autre part, le motif fixant les facteurs transcriptionnels H2TF1/NF- $\kappa$ B. La mutagenèse dirigée réalisée sur les deux éléments IRE et H2TF1/NF- $\kappa$ B suggère que ces deux catégories d'éléments sont requises pour l'activation par la pro-

téine X. Celle-ci activerait le promoteur du gène du CMH de classe I après avoir formé un complexe avec les différents facteurs capables de se fixer à lui.

Le VHB ne semble pas être directement cytopathique et les dommages observés paraissent réalisés par la réponse immunitaire cellulaire T qui reconnaît un antigène viral associé au CMH de classe I. Dans un tel contexte, la transactivation des gènes du CMH de classe I par le gène X dans les hépatocytes infectés pourrait faciliter la reconnaissance par les cellules T et conditionner la nécrose hépatique observée dans l'hépatite B.

— Promoteurs pol III

Le produit du gène X est capable également d'activer la transcription à partir de certains promoteurs de classe III. Cette activité n'est pas sans rappeler celle de la protéine transactivatrice E1A de l'adénovirus qui interagit avec le facteur TFIIC. Ce facteur est un composant limitant de la transcription par l'ARN polymérase III dans les cellules infectées par l'adénovirus. Les cellules transfectées de manière stable par le gène X contiennent entre trois et six fois plus de facteur limitant. Par ailleurs, les expériences de compétition suggèrent fortement que ce facteur est le TFIIC actif et que, de ce fait, la protéine X augmente la formation de complexes de pré-initiation pol III stables, incluant l'ARN polymérase III [34]. Dans le cas de l'adénovirus, l'augmentation de la transcription des gènes dépendant de l'ARN polymérase III est requise pour une réplication virale. Cette stimulation par la protéine X pourrait donc être incluse dans un mécanisme général de stimulation des gènes et contribuer de ce fait à la transformation.

— LTR du virus de l'immuno-déficience humaine

La protéine X a été montrée capable d'augmenter l'expression génétique à partir des LTR des HIV 1 et 2, dans les cellules hépatiques mais également dans les cellules lymphoïdes CD4 + . La présence de séquences du VHB dans les cellules cibles du HIV a été souvent mentionnée [36]. Cette observation conduit à suggérer que le VHB pouvait être un co-facteur dans le développement du SIDA.

L'analyse de mutants de délétion dans

la région U3 du LTR qui contient l'essentiel des séquences régulatrices des virus HIV, a permis de déterminer les séquences *enhancer* réagissant avec le facteur NF- $\kappa$ B comme étant celles répondant à la transactivation par le produit du gène X [37]. Un des mécanismes possibles de cette transactivation consisterait en la modification par phosphorylation du répresseur cytoplasmique I $\kappa$ B, par la protéine X induisant la dissociation du complexe I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B et la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (*m/s n° 1, vol. 7, p. 67*) qui, en se fixant sur les séquences cibles du LTR, réactiverait le HIV.

En conclusion, la protéine X est un transactivateur transcriptionnel agissant vraisemblablement au niveau de l'initiation de la transcription. La transactivation par la protéine X n'est pas restreinte aux seuls éléments régulateurs du génome du VHB et dépend du contexte cellulaire. Ces arguments suggèrent un mécanisme d'action indirect, et, effectivement, la fixation de la protéine X purifiée sur des séquences d'ADN n'a pu être mise en évidence. Le mécanisme d'action pourrait être assez proche de celui de l'E1A, qui implique une interaction avec d'autres protéines cellulaires intervenant dans la transcription. En considération des quelques exemples précédemment décrits, il semble que la protéine X puisse utiliser non pas un mais plusieurs mécanismes différents en modulant son activité en fonction des variations qualitatives et quantitatives des différents facteurs transcriptionnels positifs et négatifs du cycle cellulaire.

Les nombreux promoteurs capables d'être transactivés par la protéine X pourraient avoir une étape limitante commune lors de l'initiation de la transcription et la protéine X agirait alors en augmentant l'activité des facteurs transcriptionnels impliqués dans cette étape. La protéine X pourrait également augmenter ou activer un ou plusieurs transactivateurs cellulaires de la transcription qui agissent sur de nombreux gènes, et particulièrement lors de l'expression des gènes de multiplication et de différenciation cellulaires.

#### • Domaines actifs de la protéine X

L'analyse, par mutations, des fonctions de la protéine X révèle que de

\* Promoteurs de classe II et promoteurs de classe III sont respectivement reconnus par les ARN polymérase II et III.

## RÉFÉRENCES

36. Levrero M, Balsano C, Natoli G, Avantaggiati ML, Elfassi E. Hepatitis B virus X protein transactivates the long terminal repeats of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Virol* 1990 ; 64 : 3082-6.
37. Siddiqui A, Gaynor R, Srinivasan A, Mapoles J, Wesley Farr R. Trans-activation of viral enhancers including long terminal repeat of the human immunodeficiency virus by the hepatitis B virus X protein. *Virology* 1989 ; 169 : 479-84.
38. Ritter SE, Whitten TM, Quets AT, Schloemer RH. An internal domain of the hepatitis B virus X antigen is necessary for transactivating activity. *Virology* 1991 ; 182 : 841-5.
39. 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.
40. Dejean A, Bougueleret L, Grzeschik KH, Tiollais P. Hepatitis B virus integration and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1986 ; 332 : 70-2.
41. Takada S, Koike K. Trans-activation function of a 3' truncated X gene-cell fusion product from integrated hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 5628-32.
42. Miyaki M, Sato C, Gotanda T, et al. Integration of region X of hepatitis B virus genome in human primary hepatocellular carcinomas propagated in nude mice. *J Gen Virol* 1986 ; 67 : 1449-54.
43. Höhne M, Schaefer S, Seifer M, Feitelson MA, Paul D, Gerlich WH. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J* 1990 ; 9 : 1137-45.
44. Lee TH, Finegold MJ, Shen RF, De Mayo JL, Woo SL, Butel JS. Hepatitis B virus transactivator X protein is not tumorigenic in transgenic mice. *J Virol* 1990 ; 64 : 5939-47.
45. Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBX gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991 ; 351 : 317-20.
- courtes délétions aux extrémités N et C terminales n'interfèrent pas avec l'activité transactivatrice [36, 38]. Un domaine actif a été localisé entre les acides aminés 103 et 117. Ces résultats sont préliminaires, et une mutagenèse dirigée du gène X complet devrait permettre d'identifier d'autres domaines potentiellement impliqués dans la transactivation. Cette mutagenèse devrait également permettre de localiser le domaine responsable de l'activité kinase de la protéine X.
- **Implication des autres protéines virales du VHB dans la transactivation**
- Il n'a pas été décelé de différence dans l'intensité de la transactivation quand le produit du gène X est exprimé dans son contexte naturel, c'est-à-dire à partir d'un génome complet du VHB ou quand il est exprimé à partir d'un vecteur d'expression puissant [18]. Cela suggère donc que les autres protéines virales n'influencent pas de manière significative l'effet du produit du gène X.
- **Rôle de la protéine X dans la réplication du VHB**
- La transfection transitoire de cellules permissives par des vecteurs contenant le génome du VHB et possédant une mutation qui déphase le cadre de lecture du gène X, diminue mais n'abolit pas la transcription et la synthèse d'ADN [39]. Cependant, ces virus mutés, capables de se répliquer *ex vivo*, semblent *in vivo* incapables de produire une infection. Ces résultats suggèrent que la protéine X est un transactivateur qui, *ex vivo*, n'est pas indispensable à la réplication virale, mais qui est essentiel *in vivo*.

### Propriétés oncogéniques du gène X

Le virus de l'hépatite B est impliqué dans le développement du cancer primitif du foie [7] (*m/s n° 3, vol. 6, p. 306*). Toutefois, le rôle du virus dans le développement de l'hépatocarcinome reste à clarifier. L'intégration de séquences virales directement responsables de l'activation de proto-oncogènes n'a pu être observée que dans de très rares tumeurs [40]. Le gène X, qui est un transactivateur général, pourrait évidemment être impliqué dans le processus de transformation.

- **Présence de séquences X intégrées dans les tumeurs**

Bien que l'intégration ne soit pas une étape nécessaire à la réplication du VHB, le génome viral est souvent intégré sous de nombreuses formes sans profil particulier : soit complet, soit subgénomique, réarrangé avec délétions, inversions ou duplications. Cependant, la présence de séquences X, complètes ou délétées en 3', a été observée dans de nombreuses tumeurs. En dépit de cette délétion en 3' liée à l'intégration, le produit du gène X garde toutefois son activité [41].

Ces résultats suggèrent donc que lorsque le génome viral est intégré et non répliatif, le gène X garde sa capacité à s'exprimer même s'il est tronqué. L'effet transactivateur du gène X pourrait alors être utilisé en deux temps : dans une phase précoce, où l'activité de la protéine X du génome non intégré consisterait à augmenter la réplication du virus en agissant sur les gènes viraux, et peut-être également sur des gènes cellulaires ; dans une phase tardive, au cours de laquelle le génome intégré, réarrangé et non répliatif, affecterait par son expression la multiplication et la différenciation cellulaire.

- **Augmentation de l'expression du gène *c-myc* et formation de tumeurs chez les souris *nude***

La transfection de cellules de souris NIH3T3 par un vecteur exprimant la protéine X induit l'augmentation de l'expression du gène *c-myc*. L'injection de telles cellules transfectées induit chez les souris *nude* la formation de tumeurs [42]. De plus, des cellules hépatiques de rat immortalisées par l'antigène T du SV40, mais non malignes, puis transfectées par l'ADN du VHB, donnent des clones stables de cellules répliquant le VHB. Ces clones cellulaires possèdent les caractéristiques de croissance de cellules malignes et leur injection à des souris *nude* induit le développement d'hépatocarcinomes [43]. L'ADN viral y apparaît réarrangé, et l'expression du gène X semble maintenue dans la plupart des cellules reclonees à partir de la tumeur initiale. Cette étude apporte la première démonstration que le VHB a un potentiel oncogénique dans un système expérimental.

- **Développement oncogénique**

d'hépatocarcinomes chez les souris transgéniques

Il existe plusieurs lignées de souris transgéniques exprimant le gène *X*, soit à partir du génome viral entier, soit à partir de constructions contenant le gène *X* sous le contrôle de promoteurs inductibles. Dans ces conditions, certaines souris ont développé un hépatocarcinome et d'autres non. Par exemple, plusieurs lignées de souris transgéniques possédant le gène *X* sous le contrôle de la région régulatrice du gène humain  $\alpha 1$ -antitrypsine ont été établies, et l'expression de la protéine *X* dans le foie de ces animaux a été démontrée. L'analyse des effets potentiellement pathologiques de la protéine *X*, *in vivo*, indique que la protéine *X* ainsi exprimée n'induit que quelques dommages hépatiques mais pas d'hépatocarcinome [44]. Cependant, récemment, il a été établi que lorsque le gène *X* est exprimé à partir de son propre promoteur associé à *EnI*, un pourcentage très important de souris développent un hépatocarcinome, les souris mâles étant plus susceptibles (90 %) que les souris femelles (60 %) [45] (*m/s* n° 7, vol. 7, p. 743). Ces observations sont en accord avec les données épidémiologiques de la fréquence des hépatocarcinomes consécutifs à l'infection par le VHB. L'expression du gène *X* n'est pas décelée dans toutes les cellules du foie de ces souris transgéniques, ce qui pourrait être en relation avec l'état de différenciation des sous-populations de cellules hépatiques. L'ensemble de ces données suggère que l'expression du gène *X*, *in vivo*, est en corrélation avec le développement du cancer du foie. En conclusion, le gène *HB-X* joue un rôle important de transactivateur indirect de gènes viraux et cellulaires et pourrait être impliqué dans le potentiel oncogénique du virus de l'hépatite B.

Le rôle transactivateur attribué au gène *X* dans la réplication et dans l'oncogenèse pourrait être encore plus complexe si, comme cela est possible, plusieurs protéines sont codées par ce gène ■

#### Remerciements

Mes remerciements vont au professeur Jacques Pilot pour ses conseils lors de la rédaction de cet article.

## Summary

### The *X* gene of the hepatitis B virus transactivator and potential oncogene

Hepatitis B virus (HBV) contains an open reading frame (ORF) called *X* which can encode a 17 kDa polypeptide of 154 amino-acids. This protein is antigenic in man and represents a new serological marker of the HBV infection. The *X*-ORF encodes a transcriptional activator capable of stimulating the expression of genes under the control of the HBV enhancer as well as several RNA polymerase II and III promoters. This protein has an intrinsic serine/threonine protein-kinase activity which could be related to its transactivation function. The *X* protein does not bind directly to DNA but functions very likely by interacting with — or modifying — multiple cellular factors involved in transcription regulation. Stably transfected clones display malignant growth characteristics. Transgenic mice expressing the *X* gene product alone develop hepatocellular carcinomas. These data taken altogether suggest that the HBV-*X* protein, by its transactivating activity, plays a central role in viral hepatocarcinogenesis.

#### TIRÉS A PART

É. Elfassi.