

Souris transgéniques pour le génome du virus de l'hépatite B

La création de souris transgéniques exprimant tout ou partie du génome du virus de l'hépatite B a permis d'étudier la spécificité tissulaire d'expression et de réplication du virus, et de démontrer le rôle activateur des hormones sexuelles, principalement la testostérone, sur l'expression du gène S. Les animaux sont tolérants aux antigènes viraux et ne développent aucune réaction immunologique. Dans certaines expériences où l'antigène codé par les régions pré-S et S s'accumule en très grande quantité dans le réticulum endoplasmique, les animaux ont une cytolysse hépatique avec apparition de nodules de régénération et, finalement, d'hépatocarcinomes, mimant l'un des mécanismes qui peut, chez l'homme, conduire à la cancérisation de foies chroniquement infectés par le virus.

Christine Pourcel

Le virus de l'hépatite B (VHB) humain appartient à la famille des hepadnavirus, virus hépatotropes dont le génome est un ADN double brin d'environ 3 kb, utilisant une étape de transcription inverse pour sa réplication (figure 1, p. 627). Les autres membres connus de la famille infectent la marmotte (WHV, *woodchuck hepatitis virus*), l'écureuil (GSHV, *ground squirrel hepatitis virus*), et le canard (DHBV, *duck hepatitis virus*) [1,2]. Après sa pénétration dans la cellule, l'ADN viral est transporté dans le noyau où il est converti en forme circulaire super-enroulée. Cette molécule sert de matrice à la transcription des ARNs viraux (figure 2, p. 628). L'ARN pré-génome (3,5 kb), qui couvre plus de la totalité du génome viral, est encapsidé avec une polyprotéine virale contenant plusieurs activités

enzymatiques nécessaires à la réplication. Un brin d'ADN complémentaire (ou brin-) est synthétisé par transcription inverse puis cet ADN sert à son tour de matrice à la synthèse du deuxième brin d'ADN (ou brin+). La polyprotéine contient une activité ADN polymérase ARN- et ADN-dépendante, une activité de type ribonucléase H permettant la digestion de l'ARN pré-génome et une protéine dite terminale servant à initier la synthèse du brin d'ADN- [3]. Les différents intermédiaires de réplication sont localisés dans le cytoplasme à l'intérieur de capsides virales porteuses de l'antigène de capsidite ou AgHBc. Ces capsides sont ensuite enveloppées d'une bicouche lipidique porteuse de l'antigène de surface viral ou AgHBs et les virions sont sécrétés sans lyse cellulaire. Les cellules infectées sécrètent également de larges quantités d'enveloppes

ADRESSE

C. Pourcel : chargée de recherche à l'Institut Pasteur. Inserm U. 163, Cnrs UA 271, UREG, Institut Pasteur, 28 rue du docteur Roux, 75015 Paris, France.

vides (particules de 22 nm) et de polypeptides apparentés au polypeptide C et portant l'antigène e ou AgHBe.

Au cours d'une infection naturelle par les hepadnavirus, le foie semble être la cible préférentielle puisque le virus y est retrouvé très rapidement après sa pénétration dans l'organisme. De plus, la symptomatologie

liée à l'infection est uniquement hépatique et va de l'hépatite aiguë à l'hépatite chronique, la cirrhose et l'hépatocarcinome. Cependant, la présence d'ADN et de protéines virales dans d'autres tissus (lymphocytes, rein, pancréas chez l'homme) et même de formes répliquatives du génome viral (rate chez la marmotte, rein, pancréas chez le canard) montre

que le virus peut pénétrer dans des cellules non hépatiques et s'y multiplier.

Afin de comprendre les bases de cette restriction d'hôte et de tissus, de nombreuses expériences ont été effectuées dans des systèmes de cultures cellulaires et ont permis de mettre en évidence la présence de séquences régulatrices dites *enhancer* semblant fonctionner préférentiellement dans des cellules d'origine hépatique.

De plus, les seules cellules qu'il ait été possible d'infecter *in vitro* par des virions sont des hépatocytes primaires différenciés [4]. Les récepteurs cellulaires reconnus par les virions sont très probablement absents dans les lignées d'hépatomes, y compris dans les plus différenciées d'entre elles, et constituent un des éléments essentiels de la spécificité d'hôte et de tissu.

Les nombreuses observations cliniques suggèrent que les lésions hépatiques liées à une infection virale sont dues principalement à la réponse immunitaire dont la cible serait l'AgHBe. La mort cellulaire est suivie de régénération et celle-ci, induite continuellement au cours des maladies chroniques, conduit souvent au développement d'une cirrhose. C'est aussi durant cette longue phase chronique que l'hépatocarcinome apparaît [5].

Le VHB n'infecte que l'homme et le chimpanzé, ce qui réduit considérablement le nombre des études portant sur le cycle de multiplication du virus et sur ses interactions avec son hôte. Certes la découverte des autres virus de la famille des hepadna a permis rapidement de décrire le cycle de répliquaison de ces virus et de confirmer leur rôle dans le développement des hépatocarcinomes [6]. Mais il n'est cependant pas possible d'extrapoler à l'infection de l'homme par le VHB toutes ces observations. La mise au point des techniques de transgénèse au début des années 1980 a ouvert la voie à la mise en place d'un nouveau système d'étude des virus humains chez l'animal. Cette technique consiste à injecter un ADN dans l'embryon, le plus souvent de souris, au stade une cellule. Cet ADN peut s'intégrer dans le génome cellulaire et être transmis aux générations suivantes, généralement sans réarrangement [7]. L'ani-

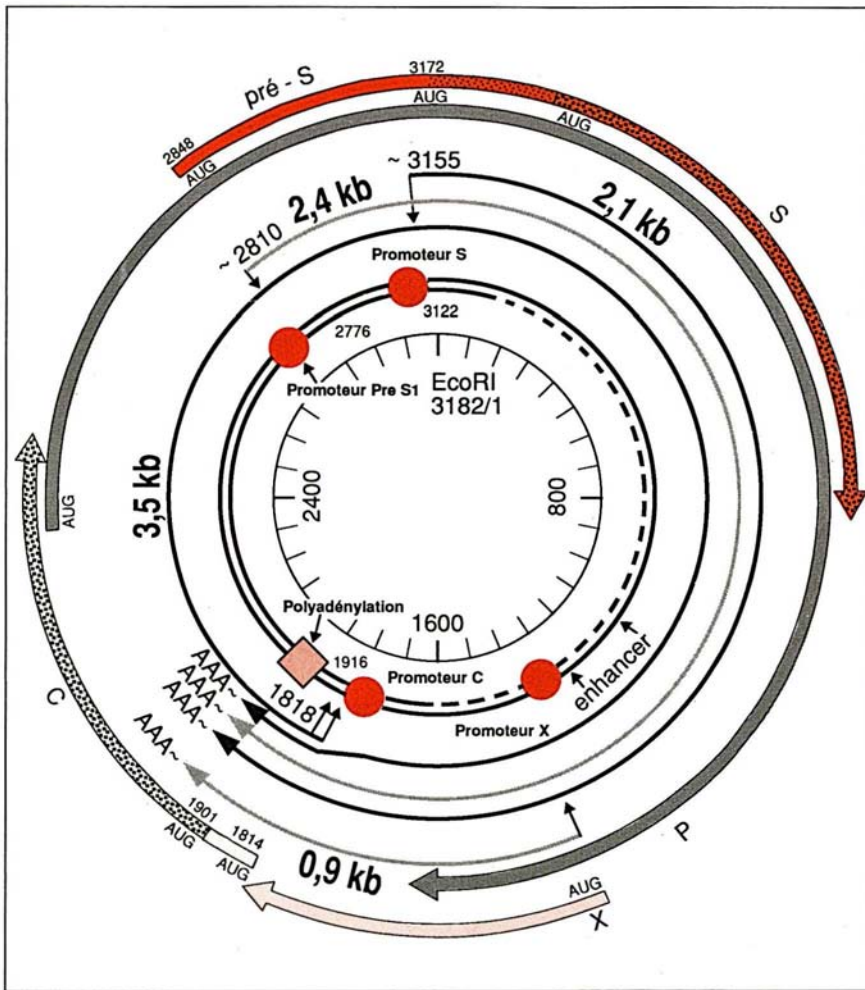


Figure 1. **Carte physique du virus de l'hépatite B.** L'ADN génomique d'environ 3 200 paires de bases, est circulaire, partiellement double brin. Les principales phases de lecture sont la région pré-S et S codant pour les protéines d'enveloppe, pré-S1, pré-S2 et S, la région pré-C et C codant pour le polypeptide e et la protéine de capsid C, la région P codant pour la polymérase. Les protéines virales sont produites à partir de quatre types d'ARN. Les ARN de 2,1 et 2,4 kb codent pour les protéines d'enveloppe. Les ARN de 3,5 kb sont de deux sortes, l'une servant de pré-génome et codant pour la polymérase et les protéines de capsid et l'autre codant pour le polypeptide e. La protéine X, qui semble être un transactivateur, est synthétisée à partir d'un ARN de 0,9 kb. Tous ces ARN sont synthétisés sous le contrôle de promoteurs différents et utilisent le même arrêt de transcription. Les ARN de 3,5 kb contiennent une redondance de 100 paires de bases et nécessitent donc pour leur synthèse soit une structure circulaire, soit un tandem tête-à-queue. GRE est une séquence de fixation du récepteur aux glucocorticoïdes. (D'après Tiollais et al. [1].)

RÉFÉRENCES

1. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985 ; 317 : 489-95.
2. Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepadnaviral P-gene. *Ann Rev Biochem* 1987 ; 56 : 651-93.
3. Bartenschlager R, Schaller H. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J* 1988 ; 7 : 4185-92.
4. Tuttleman J, Pugh JC, Summers JW. *In vitro* infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J Virol* 1986 ; 58 : 17-25.
5. Popper H, Shafritz DA, Hoofnagle JH. Relation of the hepatitis B virus carrier state to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1987 ; 7 : 764-72.
6. Mason WS, Taylor JM. Experimental systems for the study of hepadnavirus and hepatitis delta virus infections. *Hepatology* 1989 ; 9 : 635-45.
7. Babinet C, Morello D. Animaux transgéniques : une voie nouvelle pour l'étude du développement. *médecine/sciences* 1986 ; 2 : 253-9.
8. Babinet C, Farza H, Morello D, Hadchouel M, Pourcel C. Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice. *Science* 1985 ; 230 : 1160-3.
9. Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, *et al.* A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* 1985 ; 230 : 1157-60.
10. Burk RD, DeLoia JA, El Awady MK, Gearhart JD. Tissue preferential expression of the hepatitis B virus (HBV) surface antigen gene in two lines of HBV transgenic mice. *J Virol* 1988 ; 62 : 649-54.
11. Farza H, Hadchouel M, Scotto J, Tiollais P, Babinet C, Pourcel C. Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome. *J Virol* 1988 ; 62 : 4144-52.
12. Araki K, Miyazaki J, Hino O, *et al.* Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 207-11.
13. Chisari FV, Filipi P, Buras J, *et al.* Structural and pathological effect of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 6909-13.

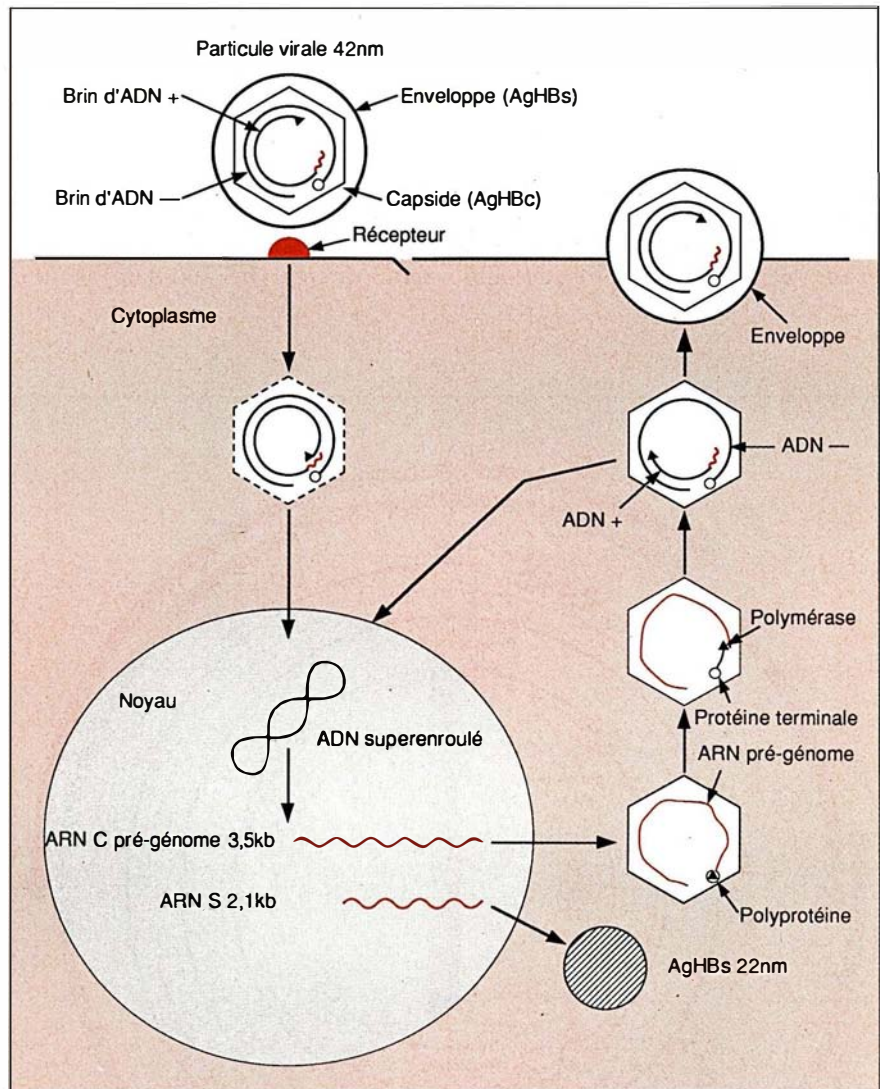


Figure 2. **Multiplication des hepadnavirus.** Le virus reconnaît un récepteur spécifique de son hôte et le génome viral est transporté dans le noyau. Au cours d'une infection naturelle, l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire n'est pas une étape indispensable à la réplication. L'ADN super-enroulé est la matrice de la transcription virale et est maintenu par recyclage d'une partie des formes répliquatives cytoplasmiques. Les intermédiaires de réplication encapsidés sont enveloppés au niveau du réticulum endoplasmique et les virions sont sécrétés sans lyse cellulaire.

mal transgénique obtenu a donc dans chacune de ses cellules le nouveau matériel génétique et il est possible d'en analyser l'expression dans différents tissus au cours du développement et en réponse à des stimulations par des facteurs d'hôte (sexe, âge) ou des substances exogènes. Dans le cas particulier de l'étude d'un virus, cette approche permet

d'étudier les effets de l'expression de divers gènes viraux dans les différents tissus de l'organisme, d'analyser les transactivations agissant sur les séquences régulatrices virales et d'étudier les différentes étapes de la multiplication virale et ceci sans restriction due à l'absence de récepteurs au virus chez l'animal, puisque l'étape de pénétration du virus dans

la cellule n'est pas nécessaire. Cette approche permet en outre de dissocier complètement les phénomènes dus à l'expression et à la réplication virale de ceux liés à la réaction immunitaire qui normalement ne doivent pas intervenir dans ce modèle. En effet, les gènes viraux

étant exprimés avant la naissance, les protéines virales sont considérées comme des protéines de l'hôte.

Séquences injectées

La plupart des expériences que nous allons décrire ont été réalisées par

injection du génome complet du VHB ou de gènes viraux contrôlés par leurs propres signaux de régulation (figure 3 et [8, 12]). Cependant, dans ces conditions, peu de souris expriment les gènes introduits (Tableau I, p. 630) et les taux d'expression sont variables probablement à cause de l'influence des séquences génomiques adjacentes (effet de position) sur le fonctionnement des promoteurs viraux. C'est pourquoi une équipe, s'intéressant principalement à l'effet du produit des gènes viraux sur l'animal, a préféré utiliser un promoteur exogène dont l'activité est reproductible et échappe à l'effet de position. Deux promoteurs forts permettant l'expression ciblée d'un gène exogène dans le foie ont été choisis pour exprimer les gènes d'enveloppe du VHB (pré-S1, pré-S2, S) : le promoteur du gène métallothionéine de la souris (Met) et celui du gène de l'albumine de la souris (Alb) (figure 3 et [9, 13]).

Chez toutes les souris obtenues, une à plusieurs copies d'ADN viral étaient intégrées à un site particulier et dans certains cas des formes de réplication ont été observées. A une exception près, l'ADN viral a été transmis aux générations suivantes sans réarrangement et des lignées ont été établies. Nous allons traiter de plusieurs aspects du cycle viral pour lesquels des données nouvelles ont été obtenues, de la régulation de la transcription des gènes viraux, de la réplication et des désordres induits. Les souris transgéniques contenant la totalité du génome viral ont été élevées dans une pièce classée L3 à l'Institut Pasteur et P2 au Japon et manipulées par des expérimentateurs vaccinés.

Contrôle de la transcription et de la réplication des séquences viraux transgéniques

Les gènes viraux sont exprimés préférentiellement dans le foie et le rein. L'analyse du fonctionnement des promoteurs viraux dans des cellules en culture a conduit à des conclusions contradictoires concernant la spécificité d'espèce et de tissus de ces promoteurs ainsi que leur efficacité. L'expression du gène S à partir de

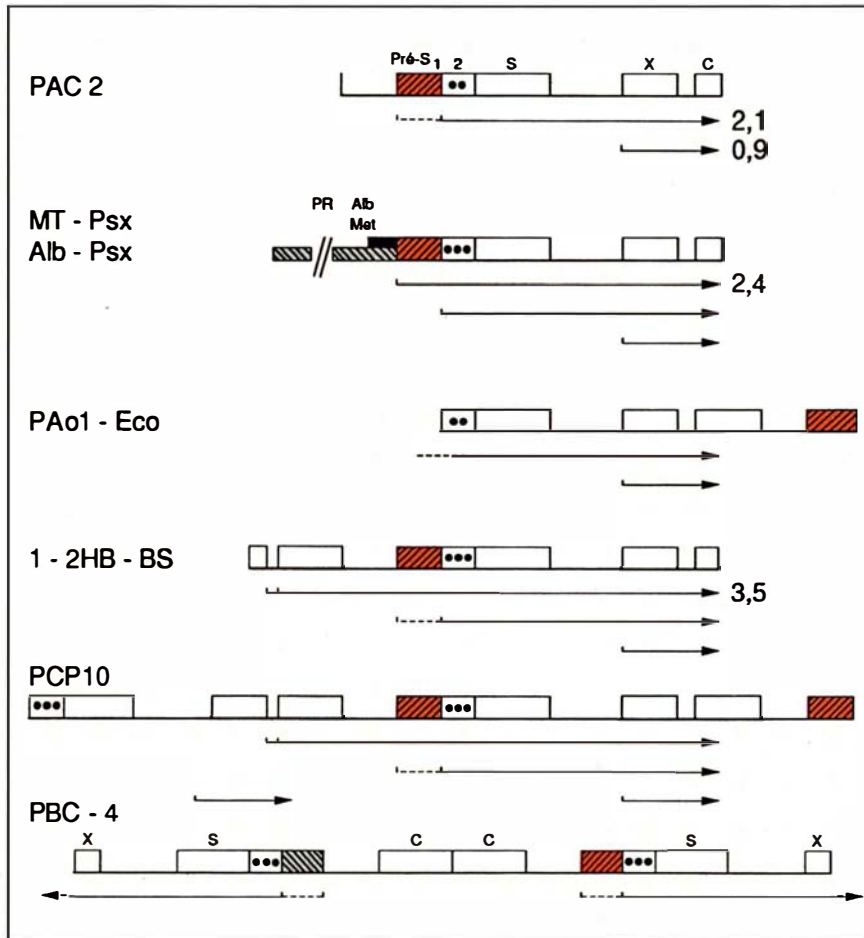


Figure 3. **Structure des séquences injectées.** Les séquences virales clonées dans PAC2, MT-PSX et PCP10 proviennent d'un même isolat ayv. 1-2-HB-BS provient d'un isolat adr4. Les différentes cartes de restriction utilisent comme O le site EcoRI commun au niveau du début de pré-S2. PAC2 : le fragment BgIII, 2425-0-1986 a été cloné dans PBR322 au site BamHI et le plasmide recombinant complet a été injecté. MT-PSX : le fragment BgIII 2848-0-1986 a été cloné derrière le promoteur (PR) et les séquences régulatrices du gène métallothionéine modulables par le zinc et les glucocorticoïdes. ALB-PSX : le même fragment BgIII est cloné derrière le promoteur et 12 kb de séquences génomiques en amont du gène de l'albumine. Dans les deux cas, le fragment a été excisé du plasmide avant injection. Les démarrages de transcription peuvent être ceux du promoteur exogène ou ceux du VHB et l'arrêt de transcription est celui du VHB. PA01-Eco : un génome complet cloné au site EcoRI a été excisé du plasmide et injecté sous forme linéaire. 1-2HB-BS : un dimère partiel constitué d'un génome complet plus 619 paires de bases a été injecté sous forme linéaire. PCP10 : deux génomes complets clonés par le site EcoRI sous forme d'un tandem tête-à-queue ont été injectés avec le plasmide vecteur. BC-4 : un fragment d'ADN viral de 5,4 kb a été cloné à partir d'un hépatocarcinome. Il contient des séquences répétées inversées pouvant former une structure secondaire. Ce fragment, libre de toute séquence plasmidique, a été injecté sous forme linéaire.

| Tableau I CARACTÉRISATION DES SOURIS | | | | | | |
|---|--------------|--|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Plasmide recombinant | Plasmide (1) | Nombre de souris AgHBs ⁺ total VHB ⁺ (2) | Nom des souris étudiées | Nombre de copies VHB intégrées | Transmission (3) | Référence |
| VHB seul | | | | 4 | hétérozygotes AgHBs ⁻ | |
| | | | E36 | < 1 | homozygotes inhibition maternelle | |
| PAC 2 | + | 2/7 | E11 | > 1 | mutation dominante homozygotes létaux | Babinet <i>et al.</i> [8] |
| PAC 2 | + | 1/10 | 7-2 | 5-10 | hétérozygotes | Chisari <i>et al.</i> [9] |
| PA01-Eco | - | 2/2 | G7 | < 1 | homozygotes | Burk <i>et al.</i> [10] |
| | | | G26 | > 1 | homozygotes | |
| pCP10 | + | 1/9 | PC21 | multiples | stérile | Farza <i>et al.</i> [11] |
| 1-2 HB-BS | - | 2/8 | 1-2 HB-BS10 | non décrit | hétérozygotes | Araki <i>et al.</i> [12] |
| VHB + promoteur exogène | | | TM 18-11 + | multiples | hétérozygotes | |
| Met-VHB | - | 2/6 | TM 23-3 | multiples | | Chisari <i>et al.</i> [9] |
| Alb-VHB | - | 8/8 | TM 45-2 | multiples | hétérozygotes | |
| | | | 45-3 | multiples | hétérozygotes | Chisari <i>et al.</i> [13] |
| | | | 50-4 | multiples | hétérozygotes | |
| VHB réarrangé | | | | | | |
| PBC4-5.4B | - | 0/3 | H2-2 p | multiples | hétérozygotes | Hino <i>et al.</i> [14] |

1 = présence de séquences plasmidiques dans l'ADN injecté ; 2 = nombre de souris exprimant l'AgHBs par rapport au nombre total de souris fondatrices contenant les séquences virales ; 3 = des lignées ont été établies pour toutes les souris exprimant l'AgHBs à l'exception de PC21 qui était stérile. Des homozygotes ont pu être obtenus dans certains cas. Chez E36, des séquences virales étaient intégrées dans deux régions chromosomiques différentes et ont ségrégué à la première génération. E11 a une mutation dominante due à l'insertion du transgène.

son propre promoteur peut être obtenue dans pratiquement tous les types cellulaires en culture, de façon transitoire ou stable, avec cependant de très importantes variations quantitatives suggérant que l'action de facteurs spécifiques du foie est nécessaire à une activité maximale du

promoteur. Il est également possible d'obtenir, dans différents types cellulaires en culture, la synthèse du plus grand des ARN (3,5 kb) contenant la région pré-C et responsable de la synthèse de l'AgHBe. En revanche, la synthèse de l'ARN C/pré-génome initiée environ 20 nucléotides en aval

a été obtenue uniquement dans des lignées d'hépatocarcinomes humains très différenciées [15]. Le fonctionnement des promoteurs X et pré-S1 (figure 1) reste très mal connu. Leur activité, une fois liés à des gènes « rapporteur », a été clairement démontrée dans des cultures cellu-

lares [16, 17]. Cependant, durant l'infection, les quantités d'ARN de 2,4 kb (pré-S1, pré-S2, S) et de 0,9 kb (X) (figure 1) sont au-dessous du seuil de détection.

Les premières souris produites par notre groupe ne contenaient qu'une partie du génome viral cloné dans un vecteur plasmidique (recombinant PAC2, figure 3). Nous avons montré au préalable que ce plasmide permettait l'expression du gène S dans des fibroblastes de souris. Les cellules sécrétaient des particules d'AgHBs tout à fait semblables aux particules d'un sérum humain infecté [18]. La délétion du gène de capsid C permettait d'éliminer les risques d'infection et ne supprimait aucune des séquences régulatrices connues. Nous avons obtenu deux lignées de souris indépendantes (E11 et E36), contenant une copie du plasmide

injecté et exprimant l'ARN S de 2,1 kb spécifiquement dans le foie (Tableau II et [8]). Des particules d'AgHBs sont sécrétées dans le sérum des souris et les taux d'expression obtenus sont comparables à ceux de porteurs chroniques en absence de réplication virale. L'expression du gène S dans le foie commence au 14^e jour du développement en même temps que celle de l'albumine.

Deux lignées de souris produisant l'AgHBs ont été également obtenues par Burk *et al.* [10] par injection du génome viral complet sous forme linéaire. Le site enzymatique choisi sépare le gène S de son promoteur (PAO1-Eco, figure 3) et les unités de transcription ne peuvent être reconstituées qu'à partir de dimères en tandem tête-à-queue*. Une des souris obtenues par ce groupe a conservé l'ensemble des séquences virales

(G26) alors que chez la deuxième (G7), une fusion avec un promoteur cellulaire permet la transcription du gène S. Cependant, dans les deux cas, l'expression est préférentielle dans le foie et le rein.

Afin d'étudier le fonctionnement de l'ensemble des gènes viraux, nous avons ensuite utilisé un recombinant contenant deux génomes viraux en tandem tête-à-queue. Ce plasmide (recombinant PCP10, figure 3) avait également été étudié par nous-même [18] et d'autres dans de nombreux systèmes de culture cellulaire et était infectieux chez le chimpanzé

* Tandem tête-à-queue : intégration de deux molécules linéaires et contiguës de la séquence injectée, toutes deux dans la même orientation, « à la queue leu leu ».

Tableau II

EXPRESSION DES GÈNES VIRAUX ET RÉPLICATION

| Souris exprimant l'ARN S | Spécificité tissulaire d'expression | | | ARN 0,9 kb X | Réplication | Régulation |
|--------------------------|-------------------------------------|------|---|----------------|-------------|-------------------------|
| | ARN 2,1 kb S et 3,5 kb C pré-génome | | | | | |
| | Foie | Rein | Autre | | | |
| E36 | +++ | - | - | testicule foie | - | glucocorticoïde |
| E11 | +++ | - | - | testicule foie | - | hormones |
| G7 | +++ | ++ | poumon estomac intestin + pancréas | - | - | sexuelles |
| G26 | +++ | + | estomac ± | - | - | |
| ARN C, S PC21 | ++ | ++ | cœur ++ | testicule | + | ND |
| 1-2 HB-BS | +++ | ++ | - | testicule | + | constitutif |
| ARN S-hybride MT-PSX | +++ | ++ | testicule cœur poumon ± rate thymus | testicule | | zinc glucocorticoïde |
| Alb-PSX | +++ | ++ | ND | | - | constitutif |

ND : non déterminé.

RÉFÉRENCES

14. Hino O, Nomura K, Ohtake K, *et al.* Rearrangements of integrated hepatitis B virus DNA in transgenic mice. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan R Liss Inc, 1988: 752-5.
15. Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JI, Essex M. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 1986; 29: 37-47.
16. Malpierce Y, Michel ML, Carloni G, Revel M, Tiollais P, Weissbach J. The gene S promoter of hepatitis B virus confers constitutive gene expression. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 4645-54.
17. Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2513-7.
18. Pourcel C, Louise A, Gervais M, Chenciner N, Dubois MF, Tiollais P. Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in mouse cells transformed with cloned viral DNA. *J Virol* 1982; 42: 100-5.
19. Will H, Cattaneo R, Koch HG, *et al.* Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature* 1982; 229: 740-2.
20. Halpern MM, England JM, Deery DT, Petcu DJ, Mason WS, Molnar-Kimber KL. Viral nucleic acid synthesis and antigen accumulation in pancreas and kidney of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 4865-9.
21. Pinkert CA, Ornitz DM, Brinster RL, Palmiter RD. An albumin enhancer located 10kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes Dev* 1987; 1: 268-76.
22. Palmiter RD, Brinster RL. Germline transformation of mice. *Annu Rev Genet* 1986; 20: 465-99.
23. Farza H, Salmon AM, Hadchouel M, *et al.* Hepatitis B surface antigen gene expression is regulated by sex steroids and glucocorticoids in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1187-91.
- [19]. Nous avons obtenu une souris (PC21) produisant l'AgHBs et l'AgHBe, mais qui n'a pas permis d'établir une lignée. Chez cette souris, les gènes viraux étaient transcrits dans le foie, le rein et le cœur. Dans le même ordre d'idée, le groupe de Yamamura a utilisé un dimère partiel respectant les unités de transcription des gènes viraux. En effet, il suffit d'une redondance de quelques centaines de paires de bases dans la région contenant le promoteur C, les sites d'initiation et d'arrêt de transcription du message de 3,5 kb (*figure 1*) pour obtenir le démarrage de transcription des ARNs de 3,5 kb et leur terminaison aux sites normaux (1-2HB-BS, *figure 3*). Ce groupe a également obtenu des souris exprimant tous les gènes viraux principalement dans le foie et le rein. Chez ces six souris contenant diverses séquences du VHB, l'expression de l'ARN 2,4 kb correspondant au promoteur pré-S1 n'a été observée que dans le foie et en quantité très faible. L'ARN X de 0,9 kb est produit faiblement dans le foie et de façon plus importante dans les testicules. Si l'on compare les résultats obtenus par les différents groupes à partir de cinq lignées de souris indépendantes, il est possible de conclure à l'expression préférentielle des ARNs majoritaires (2,1 kb et 3,5 kb) dans deux types cellulaires, les hépatocytes et les cellules des tubules proximaux du rein. Un même schéma d'expression est observé au cours d'une infection naturelle par le virus du canard [20] et chez des souris transgéniques exprimant un gène sous le contrôle du promoteur Alb. Il pourrait s'agir d'une régulation par des facteurs transactivateurs présents dans les deux types cellulaires ou de deux séquences régulatrices indépendantes comme cela semble être le cas pour Alb [21]. Ces résultats confirment qu'il n'y a pas de spécificité d'espèce au niveau de la transcription des gènes viraux, ce qui a été largement démontré chez des souris transgéniques pour de très nombreux gènes cellulaires [22].
- Le deuxième type d'expression spécifique concerne la synthèse de l'ARN du gène X. Cet ARN est présent en quantité faible dans le foie de certaines lignées et de façon reproductible dans les testicules en l'absence de toute autre expression. Cette observation est curieuse car le testicule ne semble pas être la cible habituelle d'une multiplication virale. De telles spécificités nouvelles ont été décrites pour d'autres gènes et sont parfois dues à l'absence de séquences inhibitrices contrôlant habituellement ces gènes. L'expression du gène X pourrait également être contrôlée par le cycle cellulaire.
- L'expression du gène S est contrôlée par les hormones stéroïdes.** Un deuxième aspect important de la régulation de l'expression des gènes viraux concerne le rôle des hormones stéroïdes et plus particulièrement celui des hormones sexuelles. En effet, la fréquence des porteurs chroniques est deux fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Les concentrations d'AgHBs sériques chez ces patients sont identiques mais on ne connaît pas, en revanche, l'intensité de la multiplication virale en fonction du sexe pendant la phase aiguë de l'infection. On sait également que les glucocorticoïdes stimulent la réplication virale. Deux groupes ont rapporté une différence d'expression du gène S en fonction du sexe des souris dans quatre lignées différentes, E36, E11, G7 et G26 [23, 24]. Les femelles ont des taux de bases en AgHBs sérique cinq à dix fois plus faibles que les mâles. Pendant le développement, le niveau de transcription du gène S est identique chez les mâles et les femelles. Des taux élevés d'ARN et d'AgHBs sont observés chez les nouveau-nés, puis la production d'AgHBs (mais pas celle de l'ARN) diminue après la naissance pour ensuite augmenter à nouveau vers la puberté. La différence entre mâles et femelles est détectée après la maturation sexuelle. La castration entraîne une diminution de la synthèse de l'ARN S et de l'AgHBs, particulièrement importante chez les mâles, mais observée aussi chez les femelles. A doses pharmacologiques, la testostérone aussi bien que l'œstradiol restaurent l'expression du gène S, partiellement (60 %) chez les mâles, complètement et au-delà chez les femelles. A doses physiologiques, la testostérone est beaucoup plus active que l'œstradiol expliquant probablement la différence sexuelle observée dans la synthèse de l'AgHBs. L'injection de

déxaméthasone est également responsable d'une forte activation de l'expression du gène S.

A nouveau le fait que de tels résultats aient été observés chez des souris indépendantes possédant des transgènes insérés en des sites différents laisse supposer que des séquences virales sont responsables par elles-mêmes de cette régulation. Cependant dans la lignée 1-2HB-BS10, exprimant les gènes C et S simultanément mais à des taux très faibles, aucune différence entre les deux sexes n'a été observée.

La synthèse de l'ARN pré-génome est l'étape limitante du cycle viral. La réplication de l'ADN viral n'a été obtenue que très récemment dans des systèmes de culture cellulaire et on a longtemps pensé qu'il existait une barrière d'espèce non seulement au niveau de la pénétration, mais aussi dans certaines étapes de la réplication.

Les souris contenant soit deux copies complètes du génome VHB en tandem (PCP10), soit les séquences couvrant l'unité de transcription des ARN de 3,5 kb (1 génome VHB + 619 bp, construction 1-2 HB-BS, *figure 3*) produisent les différents ARN viraux, dont le pré-génome, et répliquent le virus dans le foie et le rein, mais aussi dans le cœur chez une des souris. Dans ces organes, on peut mettre en évidence des intermédiaires de réplication encapsidés, au nombre d'environ 50 copies par cellule, alors qu'on en détecte 500 au moins au cours d'une infection. L'AgHBc en revanche est synthétisé de façon importante et localisé dans les noyaux et le cytoplasme. Des virions complets sont sécrétés dans le sérum, mais également en quantité très faible.

Ces observations démontrent que seule la transcription de l'ARN pré-génome est limitante pour initier la réplication et permettre la production de particules virales sans qu'il existe de barrière d'espèce pour la réplication. Ceci a été confirmé par le fait que les cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 permettent la réplication du virus de l'hépatite du canard [25] et celui de la marmotte après transfection de l'ADN cloné.

Il existe cependant une différence importante entre le cycle de réplication au cours d'une infection et chez

des souris transgéniques, puisque la matrice de transcription est dans le premier cas une forme d'ADN viral super-enroulé et dans le deuxième, l'ADN intégré. Les molécules d'ADN super-enroulé sont habituellement maintenues au nombre de quelques dizaines dans le noyau par recyclage d'une partie des formes nouvellement produites (*figure 2*). Le nombre des intermédiaires de réplication cytoplasmiques est 10 à 100 fois plus élevé. Dans la plupart des systèmes de cultures cellulaires où la réplication virale est possible [15, 26] et dans les deux souris transgéniques contenant des formes répliquatives, l'ADN super-enroulé n'a pas été détecté, ce qui peut expliquer les taux relativement faibles de transcription et de réplication obtenus dans ces systèmes. Cette étape cruciale de production des formes super-enroulées pourrait nécessiter, soit une infection *de novo*, soit l'accumulation d'intermédiaires de réplication, comme nous l'avons démontré dans des hépatocytes primaires de canard infecté [27].

Conséquences pathologiques de l'expression des transgènes viraux

Chez l'homme, l'hépatite est principalement due à la mort des cellules infectées, par l'intermédiaire de la réponse immunitaire (*figure 4*, p. 634). Chez de nombreux patients infectés à la naissance et chez des malades immunosupprimés, on observe une multiplication virale importante sans lésions du foie. Il existe également une catégorie de porteurs chroniques dit sains produisant uniquement l'AgHBs et ne manifestant pas de signes d'inflammation et de nécrose cellulaire. Cependant les hépatocytes prennent souvent un aspect dit en « verre dépoli » dû à une abondance de réticulum endoplasmique (RE) chargé de particules d'AgHBs. Ces patients présentent malgré tout un risque plus élevé de développer un hépatocarcinome [28]. Des modifications structurales des hépatocytes pourraient être à l'origine de perturbations du métabolisme hépatique. Les souris transgéniques produisant

l'AgHBs avant leur naissance sont immunotolérantes, ce qui est démontré par l'absence d'anticorps anti-HBs ou de complexe immun dans le sérum. L'injection de particules d'AgHBs purifiées, de sous-type identique à celui produit par la souris n'entraîne pas de réponse immunitaire. En revanche, les souris répondent à l'injection de particules d'un sous-type différent. Par exemple, des souris contenant des séquences virales de sous-type ay, produiront, après injection de particules ad, des anticorps anti-d [29].

Les souris transgéniques produites à ce jour représentent donc un modèle de porteurs chroniques ayant une déficience immunitaire vis-à-vis des antigènes viraux et permettent d'analyser l'effet cytopathique direct des protéines virales.

Aucune conséquence pathologique n'a été décrite chez les souris exprimant les antigènes S, C et e à partir des promoteurs viraux. Par immunofluorescence, l'AgHBs n'est pas détecté dans le foie malgré la production de quantités élevées d'AgHBs dans le sérum, ce qui montre qu'il y a sécrétion efficace des particules d'AgHBs. Chez la souris PC21, des quantités importantes d'AgHBc sont révélées dans les noyaux et le cytoplasme d'environ 10 % des hépatocytes et dans les cellules tubulaires du rein en absence de tout effet pathogène.

Chez les souris Met-Psx et Alb-Psx de Chisari *et al.* (*figure 3*), la synthèse du grand polypeptide d'enveloppe (pré-S1 + pré-S2 +S) en quantités anormalement élevées, par suite de la transcription à partir du promoteur Met ou Alb, entraîne un stockage de l'AgHBs dans les hépatocytes au niveau du réticulum endoplasmique [13]. Les particules produites sont des filaments qui ne sont pas sécrétés et cela entraîne une expansion du réticulum endoplasmique (aspect en verre dépoli) et une hypertrophie des cellules. Les cellules meurent, des nodules de régénération sont observés et le foie a une organisation semblable à celle rencontrée au cours de l'hyperplasie des porteurs chroniques du VHB. Chez certaines souris, des hépatocarcinomes apparaissent spontanément après plus d'un an. Un tel stockage de protéines virales est probablement

RÉFÉRENCES

24. DeLoia JA, Burk RD, Gearhart JD. Developmental regulation of HBsAg expression in two lines of HBV transgenic mice. *J Virol* 1989; 63 : 4069-73.
25. Galle PR, Schlicht HJ, Fischer M, Schaller H. Production of infectious duck hepatitis B virus in a human hepatoma cell line. *J Virol* 1988; 62 : 1736-40.
26. Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K. Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84 : 444-8.
27. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 1986; 47 : 451-60.
28. Hoofnagle JH, Shafritz DA, Popper H. Chronic type B hepatitis and the healthy HBsAg carrier state. *Hepatology* 1987; 7 : 758-63.
29. Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, et al. Hepatitis B virus gene expression in transgenic mice. *Viruses and Human Cancer*. New York: Alan R Liss, 1987 : 493-507.
30. Miller RH, Robinson WS. Integrated hepatitis B virus DNA sequences specifying the major viral core polypeptide are methylated in PCL/PRF/5 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80 : 2534-8.
31. Hadchouel M, Farza H, Simon D, Tiollais P, Pourcel C. Maternal inhibition of hepatitis B surface antigen gene expression in transgenic mice correlates with *de novo* methylation. *Nature* 1987; 329 : 454-6.

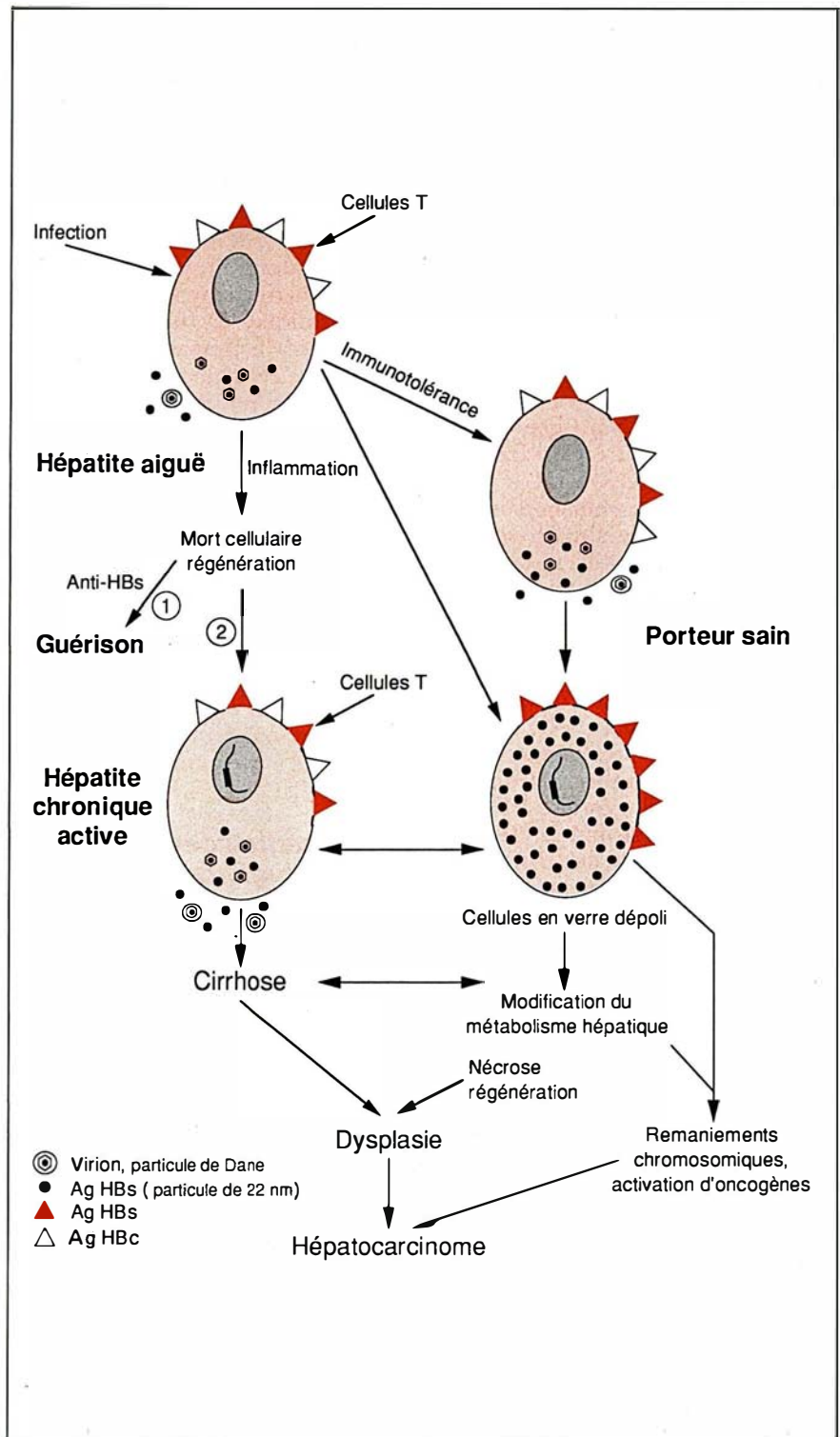


Figure 4. **Schéma de progression de l'infection aiguë à l'infection chronique, la cirrhose et l'hépatocarcinome.** L'hépatocyte infecté est la cible d'une réponse cytotoxique dirigée contre des antigènes viraux membranaires (Δ = AgHBc; \blacktriangle = AgHBs). La phase aiguë peut être suivie : (1) de l'apparition d'anti-HBs accompagnant la guérison; (2) de persistance de la multiplication virale et de l'inflammation entraînant une hépatite chronique active; (3) d'une persistance de la multiplication virale sans réponse immunitaire. Dans certains cas, l'ADN viral s'intègre et seul l'AgHBs est produit. Après une longue phase de chronicité peut se développer une cirrhose et le risque d'apparition d'un hépatocarcinome est élevé.

rarement observé au cours d'une infection naturelle et ne peut pas être la cause de la majorité des hépatocarcinomes. Les expériences de Chisari *et al.* confirment cependant que la mort des hépatocytes suivie de régénération sont des facteurs favorisant l'apparition des tumeurs.

Les souris transgéniques permettent de tester d'autres hypothèses concernant le rôle du VHB dans le développement des cancers hépatiques : par exemple si la seule production d'AgHBs et de la protéine X pendant une longue période peut augmenter la sensibilité du foie à des facteurs exogènes toxiques en modifiant le métabolisme hépatique. Nous avons montré que le développement de tumeurs par action de carcinogènes hépatiques (3 méthylaminobenzène et N-nitroso-N-diéthylamine [NDEA] était plus rapide chez des souris produisant l'AgHBs que chez des souris normales (Dragani *et al.*, résultats non publiés). Il semble qu'il s'agisse d'un effet promoteur sur la croissance des nodules tumoraux initiée par le carcinogène (figure 5).

Le groupe de Hino [14] a cherché si des séquences virales clonées à partir d'une tumeur et consistant en un tandem inversé (PBC-4) pouvaient, chez

une souris transgénique, conduire à des réarrangements chromosomiques semblables à ceux fréquemment observés dans les hépatocarcinomes. Effectivement, une instabilité du transgène a été rapportée dans la lignée, mais elle n'a pas été à l'origine d'altérations de gènes cellulaires et aucune prolifération tumorale n'a été observée.

Méthylation et expression

La méthylation des séquences VHB intégrées dans des HCC semble jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes viraux. Dans de nombreux cas de tumeurs et dans des lignées d'hépatocarcinome le gène C est méthylé et on observe uniquement la synthèse de l'AgHBs [30]. Le rôle de la méthylation pourrait être de fixer un état de répression de la transcription des gènes, ce qui permettrait aux cellules transformées d'échapper à la destruction par la réponse immunitaire. La cause de l'inactivation n'est pas connue. Il pourrait s'agir d'une conséquence de l'absence de facteurs transactivateurs dans des hépatocytes immatures ou dédifférenciés ou de

l'action de facteurs de régulation négative.

La liaison entre hyperméthylation et non-expression des gènes viraux est mise en évidence à plusieurs occasions chez les souris transgéniques. La stricte spécificité tissulaire observée chez la plupart des souris suggère que la régulation des promoteurs viraux subit un contrôle pendant le développement de l'animal. En effet, chez les souris E36 et E11, le transgène est sous-méthylé dans le foie par rapport aux autres organes, au niveau du gène S et de son promoteur. Cette région, méthylée dans le sperme d'un mâle transgénique AgHBs+ et dans l'embryon est déméthylée au cours de la maturation du foie vers le 14^e jour du développement de la souris (Pourcel *et al.* résultats non publiés). Burk *et al.* ont également montré que chez les souris G26 et G7, les séquences virales étaient sous-méthylées dans le foie par rapport aux autres organes, y compris le rein qui pourtant exprime l'AgHBs (résultats non publiés).

Le fonctionnement des promoteurs viraux à partir de séquences intégrées est fortement influencé par l'environnement génomique et dans certains

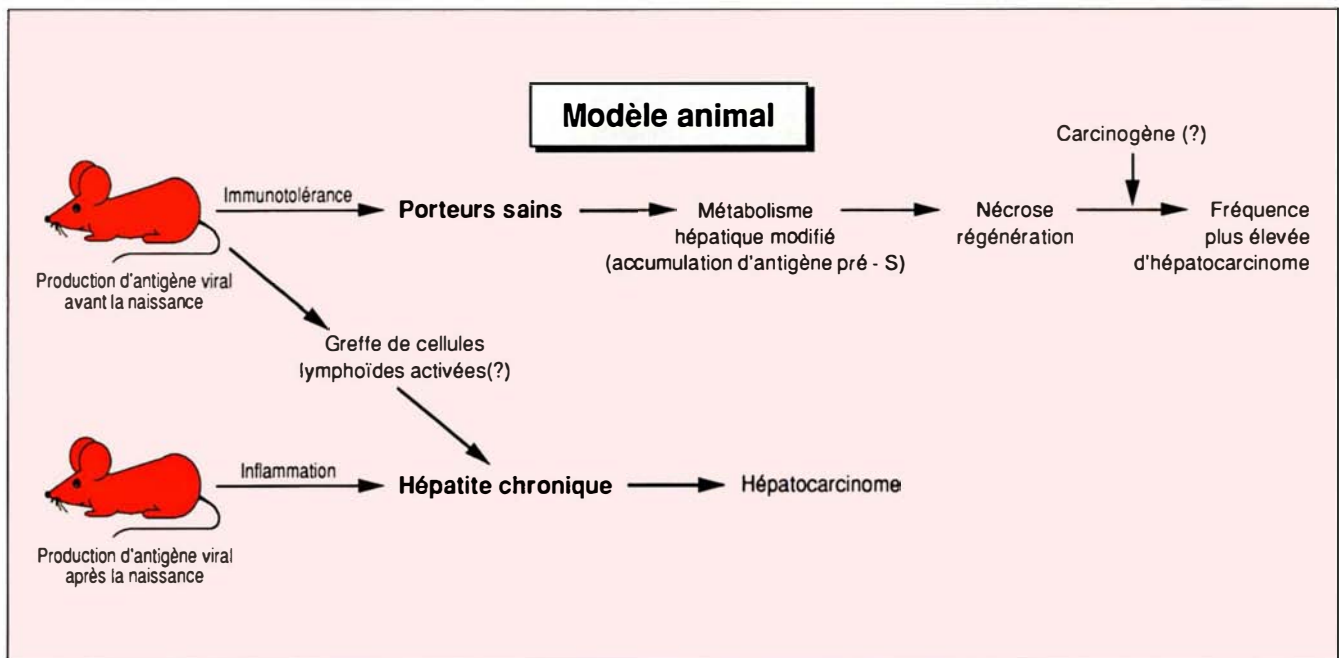


Figure 5. **La souris transgénique : modèle animal de porteur chronique du VHB.** Les souris exprimant les antigènes viraux avant leur naissance sont des porteurs sains du virus. L'induction d'une lyse cellulaire peut conduire à l'hépatite chronique et à l'hépatocarcinome. La greffe de cellules lymphoïdes actives anti-AgHBs à l'animal transgénique pourrait aboutir à la constitution d'une hépatite chronique.

cas subit une régulation négative. En effet, chez un grand nombre de souris transgéniques contenant l'ADN viral, aucune transcription des gènes viraux n'a pu être détectée et, dans tous les cas analysés, le transgène était méthylé. En revanche, toutes les souris recevant la construction Alb-HBV exprimaient le gène (8/8), ce qui suggère que la présence de 12 kb d'ADN en 5' du gène albumine permet au transgène d'échapper à l'effet de position. Il semble donc qu'en l'absence de séquences conférant une indépendance par rapport au site d'insertion, l'ADN viral soit fréquemment la cible d'une inactivation pendant le développement embryonnaire, suivie de méthylation *de novo*.

Dans la lignée E36, la transmission du transgène par une femelle aboutit à une perte totale et irréversible de l'expression du gène S et du gène X [31]. Aucun réarrangement n'a pourtant eu lieu au cours de cette transmission, mais une méthylation totale est détectée au niveau de tout le transgène, probablement sous l'influence des séquences génomiques avoisinantes. Nous avons identifié un gène codant pour des ARN spécifiques du testicule à environ 8 kb de l'insertion. Nous pensons que ce gène est inactivé dans la lignée germinale femelle et que la méthylation *de novo* qui s'ensuit s'étend au transgène. Cette méthylation pourrait être telle que les facteurs transactivateurs ne pourraient plus activer le gène S pendant la maturation du foie.

Il semble donc clair que l'expression des transgènes, comme peut-être celle des séquences VHB intégrées dans le foie des patients, nécessite l'interaction avec des protéines cellulaires et la mise en place d'un état actif de l'ADN par le jeu de la méthylation et de l'arrangement de la chromatine.

Conclusion

La production de souris transgéniques exprimant les gènes du virus de l'hépatite B peut-elle conduire à l'établissement d'un véritable modèle animal pour l'infection par ce virus ? Les différents résultats obtenus ces dernières années montrent qu'une partie du cycle viral est reproduite dans ce système : on y retrouve les différentes phases de la réplication

cytoplasmique et la production des particules d'enveloppe et de virions complets. En particulier, il a été possible de mettre en évidence un contrôle de l'expression des gènes viraux par des facteurs d'hôte tels que les stéroïdes, ce qui aurait difficilement pu être obtenu dans d'autres systèmes d'étude du virus et suffit à justifier l'emploi de souris transgéniques. Reste le problème de la pénétration du virus dans les cellules et de la formation de l'ADN super-enroulé. Les expériences faites avec des hépatocytes primaires de canards ou d'humains suggèrent que le virus peut directement pénétrer dans les cellules et s'y multiplier sans le concours d'un intermédiaire tel qu'un lymphocyte infecté, comme cela avait été proposé. Il suffirait alors de cloner le gène codant pour le récepteur (de nombreux efforts sont déjà investis dans ce but) et de l'introduire chez des souris transgéniques pour obtenir un nouvel hôte pour l'infection virale. En choisissant les promoteurs adéquats, on pourrait en théorie obtenir la pénétration du virus dans un organe donné de l'animal. Cela sera possible si aucune autre étape spécifique de l'hôte n'intervient dans le démarrage du cycle viral, perte de l'enveloppe et de la capsid, passage de l'ADN viral dans le noyau, conversion de la forme circulaire relâchée à la forme super-enroulée.

En ce qui concerne l'étude des conséquences pathologiques de l'infection virale, le problème rencontré chez les souris transgéniques produites à ce jour est l'immunotolérance aux antigènes viraux. La solution à ce problème sera l'utilisation de promoteurs inductibles après la naissance. On peut d'ores et déjà manipuler le système immunitaire en transférant à une souris produisant des antigènes viraux, des cellules lymphoïdes d'une souris syngénique normale immunisée par ces mêmes antigènes. L'avantage principal du système des souris transgéniques en virologie est ainsi qu'il permet d'étudier l'effet des produits de chacun des gènes viraux, individuellement, sur l'animal. Il devrait permettre, de plus, d'aborder le difficile problème du traitement d'une injection chronique par un virus persistant sous forme intégrée ■

Summary

Transgenic mice, an animal model for the analysis of hepatitis B virus multiplication

Transgenic mice containing hepatitis B virus DNA have been shown to support viral gene expression and DNA replication preferentially in the liver and in the kidney. In these mice S gene expression is regulated by developmental factors and by sex-steroids and glucocorticoids. The immunotolerance toward the viral antigens produced before birth prevents the immunologically-mediated cell injury. However overexpression of the large envelope protein and storage of surface antigen particles results in cell death, hyperplasia and hepatocarcinoma. The long term production of HBsAg may also be responsible for changes in the liver cell metabolism and higher tumor incidence. In many instances, hypermethylation is correlated with the inactivation of viral gene expression. Transgenic mice have proven to be a very useful system for studying viral multiplication in the animal. In addition they provide a model to analyse some aspects of the pathology linked to HBV chronic carriage.

TIRÉS A PART

C. Pourcel.

m/s n° 9 vol. 5, novembre 89